

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  
C12N 15/48, 5/08, 7/00, C12Q 1/68,  
A61K 31/70, 35/76, G01N 33/68, C07K  
14/15, 7/06, A61K 39/21

A1

(11) Numéro de publication internationale: **WO 95/21256**

(43) Date de publication internationale: 10 août 1995 (10.08.95)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00142

(22) Date de dépôt international: 6 février 1995 (06.02.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/01529	4 février 1994 (04.02.94)	FR
94/01530	4 février 1994 (04.02.94)	FR
94/01531	4 février 1994 (04.02.94)	FR
94/01532	4 février 1994 (04.02.94)	FR
94/14322	24 novembre 1994 (24.11.94)	FR
94/15810	23 décembre 1994 (23.12.94)	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO  
MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PERRON, Hervé  
[FR/FR]; 8, allée de la Colline, F-38100 Grenoble (FR).  
MALLET, François [FR/FR]; 84, rue Anatole-France, F-  
69100 Villeurbanne (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR];  
21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). BEDIN,  
Frédéric [FR/FR]; 6, rue Gaspard-André, F-69002 Lyon  
(FR). BESEME, Frédéric [FR/FR]; 39, rue de la Noyera,  
F-38090 Viffontaine (FR).

(74) Mandataire: GUERRE, Dominique; Cabinet Germain &  
Maureau, Boîte postale 3011, F-69392 Lyon Cédex 03 (FR).

(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN,  
CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NL, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US,  
UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG),  
brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.  
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si de telles modifications sont  
reques.*

(54) Title: MSRV1 VIRUS AND MSRV2 PATHOGENIC AND/OR INFECTIOUS AGENT ASSOCIATED WITH MULTIPLE  
SCLEROSIS, NUCLEIC ACID COMPONENTS AND APPLICATIONS OF SAME

(54) Titre: VIRUS MSRV1 ET AGENT PATHOGENE ET/OU INFECTANT MSRV2 ASSOCIES A LA SCLEROSE EN PLAQUES,  
LEURS CONSTITUANTS NUCLEIQUES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Composition comprising two pathogenic and/or infectious agents associated with multiple sclerosis, namely, a first agent comprising a human virus with reverse transcriptase activity, and related to a family of endogenous retroviral elements, or a variant thereof, and a second agent, or a variant thereof, wherein the two said pathogenic and/or infectious agents originate from the same viral strain selected from the strains respectively designated as POL-2, registered on 22.07.1992 with ECACC under accession number V92072202, and MS7PG, registered on 08.01.93 with ECACC under accession number V93010816, or from their variant strains.

(57) Abrégé

Composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent qui consiste en un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant issus d'une même souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	B Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Virus MSRV1 et agent pathogène et/ou infectant MSRV2  
associés à la sclérose en plaques, leurs constituants  
nucléiques et leur applications

La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une  
5 étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus  
connus testés ne s'est avéré être l'agent causal  
recherché: une revue des virus recherchés depuis des  
années dans la SEP a été faite par E. Norrby (1) et R.T.  
Johnson (2).

10 Parallèlement, la possibilité d'un facteur  
exogène et/ou infectieux est suggérée par l'existence  
d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP, comme ce qui  
a été observé dans les Iles Feroes entre 1943 et 1960 (3),  
en Sardaigne (4), en Norvège (5), ainsi que par les études  
15 sur les populations migrantes (6). Parmi tous les facteurs  
exogènes suggérés, les virus ont été étudiés le plus  
souvent et une étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes  
assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à  
20 une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (7 et  
8). Cependant, cette auto-immunité dirigée contre certains  
composants du SNC s'est révélée peu spécifique de la SEP  
et fréquente dans les inflammations du SNC, associées ou  
non à une infection (9, 10, 11 et 12). De plus, aucune des  
25 thérapeutiques immuno-suppressives n'a permis d'obtenir  
des résultats décisifs contre la SEP (13). Il semble  
maintenant probable que les manifestations "auto-immunes"  
sont induites par un mécanisme d'origine virale : co-  
sensibilisation à des déterminants viraux associés à des  
30 molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme  
moléculaire, (14) ou par expression de superantigènes  
rétroviraux (15).

Des travaux ont étayé une hypothèse selon  
laquelle un rétrovirus serait à l'origine de la maladie:  
35 la découverte récente (16) de syndromes neurologiques  
associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de

leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs (17, 18, 19, 20, 21 22, 23) à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

5           Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de SEP (24, 25 et 26). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient des  
10 anticorps susceptibles de reconnaître des protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus, et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (27).

15           Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron (24) et qualifiée d'activité "RT de type LM7". Le contenu de la publication  
20 identifiée par (24) est incorporé à la présente description, par référence.

          Récemment, les travaux de la Demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux  
25 patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans le document WO-A-9320188, dont le contenu est incorporé par référence à la présente description. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont été  
30 déposées à l'E.C.A.C.C. respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à  
35 l'E.C.A.C.C. sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée



POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

5 A partir des cultures et des isolats précités, caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attaché à caractériser le matériel nucléaire associé aux particules virales produites dans ces cultures.

10 Ainsi, les objets de l'invention sont les suivants:

(i) en tant que matériel biologique, la composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, associés à la  
15 sclérose en plaques, à savoir, un premier agent qui consiste en un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second  
20 agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant issus d'une même souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro  
25 d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes,

(ii) en tant que matériel biologique, la composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, associés à la  
sclérose en plaques, à savoir, un premier agent consistant  
30 en un virus humain possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant produits par une même  
35 lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de

l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201, et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire au moins l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants,

(iii) la composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir un premier agent consistant en un virus, ou un variant dudit virus, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et un second agent pathogène et/ou infectant, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et préférentiellement au moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

(iv) un procédé de détection d'un premier agent pathogène et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre au moins un fragment nucléique, à savoir un premier fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,

SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,  
SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires,  
et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences  
nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100  
5 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au  
moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique  
choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,  
SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,  
SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences  
10 complémentaires, et/ou un second fragment dont la séquence  
nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie  
parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs  
séquences complémentaires, et leurs séquences  
équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques  
15 présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au  
moins 70 % et de préférence au moins 90 % d'homologie avec  
une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010,  
SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences  
complémentaires, chacun desdits fragments étant notamment  
20 une sonde,

(v) une composition diagnostique, prophylactique  
ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au  
moins un fragment nucléique, à savoir un premier fragment  
nucléique dont la séquence nucléotidique comprend une  
25 séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01,  
SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05,  
SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs  
séquences complémentaires, et les séquences équivalentes,  
notamment une séquence nucléotidique présentant, pour  
30 toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de  
préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence  
nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02,  
SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06,  
SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences  
35 complémentaires, et/ou un second fragment nucléique dont  
la séquence nucléotidique comprend une séquence

nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et les séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et de préférence au moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

(vi) un procédé pour détecter et/ou identifier une association d'agents pathologiques et/ou infectants, associés à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir à au moins un dit agent pathologique et/ou infectant, et/ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, avec une composition comprenant un premier fragment nucléotidique et un second fragment nucléotidique, la séquence nucléotidique dudit premier fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et la séquence nucléotidique dudit second fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et de préférence au moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010,

SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

(vii) un procédé de détection dans un échantillon biologique d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathologique et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre une composition comprenant un premier polypeptide codé de manière partielle ou totale par le premier fragment nucléotidique défini en (vi), et/ou un second polypeptide codé de manière partielle ou totale par le deuxième fragment nucléotidique également défini en (vi),

(viii) une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le premier polypeptide et/ou le second polypeptide, définis en (vii) précédent, ou en ce qu'elle comprend un premier ligand, notamment anticorps, spécifique dudit premier polypeptide, et/ou un second ligand, notamment anticorps, spécifique dudit second polypeptide,

(ix) une lignée cellulaire, dénommée PLI-2, telle que déposée le 22.07.1992, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201, ou toute lignée cellulaire dérivée, ou toute progéniture de cette lignée, pour autant que ces lignées et progénitures soient capables de produire un anticorps obtenu à partir de la dite lignée PLI-2, ou tout autre anticorps présentant une réaction immunologique croisée avec ledit anticorps,

(x) une souche virale, dénommée POL-2 telle que déposée le 22.07.1992, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, ou toute souche dérivée, ou toute progéniture de cette souche, pour autant que ces souches et progénitures soient capables de produire un antigène obtenu à partir de la dite souche POL-2, ou tout autre antigène présentant une réaction immunologique croisée avec ledit antigène,

(xi) une lignée cellulaire, dénommée LM7PC, telle que déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, ou toute lignée cellulaire dérivée, ou toute progéniture de cette lignée, pour autant  
5 que ces lignées et progénitures soient capables de produire un anticorps obtenu à partir de la dite lignée LM7PC, ou tout autre anticorps présentant une réaction immunologique croisée avec ledit anticorps,

(xii) une souche virale, dénommée MS7PG, telle  
10 que déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, ou toute souche dérivée, ou toute progéniture de cette souche, pour autant que ces souches et progénitures soient capables de produire un antigène obtenu à partir de la dite souche MS7PG, ou tout  
15 autre antigène présentant une réaction immunologique croisée avec ledit antigène,

(xiii) en tant que matériel biologique, et à l'état purifié ou isolé, un matériel viral, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille  
20 d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi l'une quelconque des souches POL-2 et MS7PG précitées, et les souches variantes consistant en des virus comprenant au  
25 moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus desdites souches virales,

(xiv) en tant que matériel biologique, et à l'état purifié ou isolé, un matériel viral possédant une  
30 activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, associé à la sclérose en plaques, produit par l'une quelconque des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, ou par toute culture cellulaire infectée susceptible de produire un virus  
35 comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène

correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par lesdites lignées PLI-2,

(xv) un matériel viral caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi  
5 SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,  
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,  
SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs  
séquences équivalentes, notamment les séquences  
nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100  
10 monomères contigus, au moins 50 % et préférentiellement au  
moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique  
choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,  
SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,  
SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences  
15 complémentaires,

(xvi) un matériel rétroviral, associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que le gène *pol* de son génome comprend une séquence nucléotidique équivalente, et notamment présentant au moins 50 %  
20 d'homologie, de préférence au moins 65%, avec une séquence nucléotidique appartenant au gène *pol* du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9,

(xvii) un matériel rétroviral associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que le gène *pol* de son génome code pour une séquence peptidique présentant au  
25 moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par le gène *pol* du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9,

(xviii) un matériel rétroviral associé à la  
30 sclérose en plaques, caractérisé en ce que le gène *pol* de son génome code pour une séquence peptidique présentant, pour toute suite contigue d'au moins 30 acides aminés, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence  
35 nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06,

SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires,

(xix) un fragment nucléotidique, dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie  
5 parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100  
10 monomères contigus, au moins 50%, et de préférence au moins 70% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires,

15 (xx) une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un matériel viral décrit ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence  
20 nucléotidique d'un fragment décrit en (xix), notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment; une amorce préférentielle de l'invention comprend une séquence nucléotidique choisie  
25 parmi SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026, SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, et leurs séquences complémentaires,

30 (xxi) une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un matériel viral décrit ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment  
35 décrit en (xix), notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au



moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment; une sonde préférentielle selon l'invention comprend une séquence nucléotidique choisie parmi  
SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06,  
5 SEQ ID N07, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018,  
SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022,  
SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026,  
SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, et leurs séquences complémentaires,

10 (xxii) l'utilisation d'une sonde décrite en (xxi), ou d'une amorce décrite en (xx), pour détecter, séparer ou identifier, dans un échantillon biologique, un matériel viral défini ci-dessus,

(xxiii) un procédé pour détecter, séparer ou  
15 identifier, dans un échantillon biologique, le matériel viral défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, avec au moins une sonde décrite en (xxi); selon une mise en oeuvre  
20 avantageuse, avant de mettre en contact l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, avec la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce d'amplification décrite en (xx), et on amplifie ledit ARN et/ou ADN,

25 (xxiv) un procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un matériel viral, associé à la sclérose en plaques, défini précédemment, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus et/ou leur ADN et/ou ARN  
30 complémentaires, avec au moins une sonde décrite en (xxi), éventuellement on amplifie, et on détecte ledit ARN et/ou ADN,

(xxv) en tant que matériel biologique, et à l'état isolé ou purifié, un agent pathogène et/ou  
35 infectant, différent du matériel viral selon (xiii), ou (xiv) ou (xv) ou (xvi) ou (xvii) ou (xix), associé à la

sclérose en plaques, issu de l'une quelconque des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, et les souches variantes consistant en des agents pathogènes et/ou infectants comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants desdites souches virales, respectivement différents de l'un ou l'autre matériel viral desdites souches,

(xxvi) en tant que matériel biologique, et à l'état isolé ou purifié, un agent pathogène et/ou infectant, différent du matériel viral selon (xiii), ou (xiv) ou (xv) ou (xvi) ou (xvii) ou (xix), associé à la sclérose en plaques, produit par l'une quelconque des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC précitées, et toutes les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un agent pathogène et/ou infectant comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants produits par lesdites lignées PLI-2 et LM7PC, respectivement différents de l'un ou l'autre matériel viral desdites souches,

(xxvii) un agent pathogène et/ou infectant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques, présentant au moins 70 % et préférentiellement au moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires,

(xxviii) un fragment nucléotidique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs

séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70%, et de préférence au moins 90% d'homologie, avec  
5 une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires,

(xxix) une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un agent pathogène et/ou infectant défini en (xxv), ou (xxvi) ou  
10 (xxvii), caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment décrit en (xxviii), notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au  
15 moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment; une amorce préférentielle selon l'invention comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029, SEQ ID N030, SEQ ID N034,  
20 SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, et leurs séquences complémentaires,

(xxx) une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un agent pathogène et/ou infectant défini en (xxv), ou (xxvi) ou (xxvii),  
25 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment décrit en (xxviii), notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au  
30 moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment; une sonde préférentielle selon l'invention comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029,  
35 SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, et leurs séquences complémentaires,

(xxxi) l'utilisation d'une sonde décrite en (xxx), et/ou d'une amorce décrite en (xxix), pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un agent pathologique et/ou infectant défini en (xxv), ou (xxvi) ou (xxvii),

(xxxii) un procédé pour détecter, séparer ou identifier, dans un échantillon biologique, l'agent pathogène et/ou infectant défini en (xxv), ou (xxvi) ou (xxvii), caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir audit agent, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au moins une sonde décrite en (xxx); selon une mise en oeuvre avantageuse, avant de mettre en contact l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, avec la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce d'amplification décrite en (xxxi), et on amplifie ledit ARN et/ou ADN,

(xxxiii) un procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un agent infectant et/ou pathogène associé à la sclérose en plaques, défini en (xxv), ou (xxvi) ou (xxvii), caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique audit agent et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au moins une sonde décrite en (xxx), et on amplifie ledit ARN et/ou ADN,

(xxxiv) une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, notamment pour inhiber l'expression d'au moins un agent pathogène et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde décrite en (xxi), ou une sonde décrite en (xxx), et/ou au moins une amorce décrite en (xx) ou une amorce décrite en (xxix),

(xxxv) un ARN ou ADN, et notamment vecteur de répllication, comprenant un fragment décrit en (xix) ou un fragment décrit en (xxviii),

(xxxvi) un polypeptide, ayant au moins 5, et de préférence 10 acides aminés, codé par toute séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins  
5 une partie d'un fragment nucléotidique décrit en (xix) ou un fragment décrit en (xxviii),

(xxxvii) une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide défini en  
10 (xxxvi), ou en ce qu'elle comprend un ligand, notamment anticorps, spécifique d'au moins undit polypeptide,

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

15 - par souche ou isolat, on entend toute fraction biologique infectante et/ou pathogène, contenant par exemple des virus et/ou des bactéries et/ou des parasites, et générant un pouvoir pathogène et/ou antigénique, hébergée par une culture ou un hôte vivant ; à titre  
20 d'exemple; une souche virale selon la définition précédente peut contenir un agent co-infectant, par exemple un protiste pathogène,

- le terme "MSRV" utilisé dans la présente description désigne tout agent pathogène et/ou infectant,  
25 associé à la sclérose en plaques, notamment une espèce virale, les souches atténuées de ladite espèce virale, ou les particules défectives interférentes dérivées de cette espèce. Il est connu que les virus et particulièrement les virus contenant de l'ARN ont une variabilité, consécutive  
30 notamment à des taux relativement élevés de mutation spontanée (28), dont il sera tenu compte ci-après pour définir la notion d'équivalence,

- par virus humain, on entend un virus susceptible d'infecter l'être humain,

35 - compte tenu de toutes les variations naturelles ou induites, pouvant être rencontrées dans la pratique de

la présente invention, les objets de cette dernière, définis ci-dessus et dans les revendications, ont été exprimés en comprenant les équivalents ou dérivés des différents matériels biologiques définis ci-après, 5 notamment des séquences homologues nucléotidiques ou peptidiques,

- le variant d'un virus ou d'un agent pathogène et/ou infectant selon l'invention, comprend au moins un antigène reconnu par au moins un anticorps dirigé contre 10 au moins un antigène correspondant dudit virus et/ou dudit agent pathogène et/ou infectant, et/ou un génome dont toute partie est détectée par au moins une sonde d'hybridation, et/ou au moins une amorce d'amplification nucléotidique spécifique dudit virus et/ou agent pathogène 15 et/ou infectant, comme par exemple celles ayant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, à SEQ ID N038, et leurs séquences complémentaires, dans des conditions d'hybridation déterminées bien connues de l'homme de l'art,

20 - selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide ou un polynucléotide est un enchaînement de monomères, ou un biopolymère, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à tout autre fragment 25 nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures chimiques différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

30 - ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique, dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agit de l'ADN ou l'ARN, 35 la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou le nucléotide peut

être modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-  
5 désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation; au niveau du sucre, la modification peut  
10 consister dans le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (29), et au niveau du groupement phosphate, la modification peut consister dans son remplacement par des esters, notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

15 - par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence, constituent ou non une information fonctionnelle de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

20 - par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions opératoires appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former une structure complexe, notamment double ou triple, de préférence sous forme d'hélice,

25 - une sonde comprend un fragment nucléotidique synthétisé par voie chimique ou obtenu par digestion ou coupure enzymatique d'un fragment nucléotidique plus long, comprenant au moins six monomères, avantageusement de 10 à 100 monomères, de préférence 10 à 30 monomères, et  
30 possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées ; de préférence, une sonde possédant moins de 10 monomères n'est pas utilisée seule, mais l'est en présence d'autres sondes de taille aussi courte ou non ; dans certaines conditions particulières,  
35 il peut être utile d'utiliser des sondes de taille supérieure à 100 monomères ; une sonde peut notamment être

utilisée à des fins de diagnostic et il s'agira par exemple de sondes de capture et/ou de détection,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire  
5 directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi notamment parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la  
10 peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (30), "SOUTHERN BLOT" (31), "NORTHERN BLOT" qui est une technique identique à la  
20 technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (32); avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention, comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de  
25 capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- l'invention couvre également une sonde susceptible de s'hybrider in vivo ou in vitro sur l'ARN et/ou sur l'ADN, pour bloquer les phénomènes de  
30 réplication, notamment traduction et/ou transcription, et/ou pour dégrader ledit ADN et/ou ARN,

- une amorce est une sonde comprenant au moins six monomères, et avantageusement de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des  
35 conditions déterminées, pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique



d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

5           - deux séquences nucléotidiques ou peptidiques sont dites équivalentes ou dérivées l'une par rapport à l'autre, ou par rapport à une séquence de référence, si fonctionnellement les biopolymères correspondants peuvent jouer sensiblement le même rôle, sans être identiques, 10 vis-à-vis de l'application ou utilisation considérée, ou dans la technique dans laquelle elles interviennent ; sont notamment équivalentes deux séquences obtenues du fait de la variabilité naturelle, notamment mutation spontanée de l'espèce à partir de laquelle elles ont été identifiées, 15 ou induite, ainsi que des séquences homologues, l'homologie étant définie ci-après,

          - par variabilité, on entend toute modification, spontanée ou induite d'une séquence, notamment par substitution, et/ou insertion, et/ou délétion de 20 nucléotides et/ou de fragments nucléotidiques, et/ou extension et/ou raccourcissement de la séquence à l'une au moins des extrémités ; une variabilité non naturelle peut résulter des techniques de génie génétique utilisées, par exemple du choix des amorces de synthèse dégénérées ou 25 non, retenues pour amplifier un acide nucléique; cette variabilité peut se traduire par des modifications de toute séquence de départ, considérée comme référence, et pouvant être exprimées par un degré d'homologie par rapport à ladite séquence de référence,

30           - l'homologie caractérise le degré d'identité de deux fragments nucléotidiques ou peptidiques comparés; elle se mesure par le pourcentage d'identité qui est notamment déterminé par comparaison directe de séquences nucléotidiques ou peptidiques, par rapport à des séquences 35 nucléotidiques ou peptidiques de référence,

- ce pourcentage d'identité a été spécifiquement déterminé pour les fragments nucléotidiques relevant de la présente invention, homologues aux fragments identifiés par SEQ ID N01 à N09 (MSRV-1) d'une part, et ceux  
5 homologues aux fragments identifiés, par SEQ ID N010 à N012 (MSRV-2) d'autre part, ainsi que pour les sondes et amorces homologues aux sondes et amorces identifiées par SEQ ID N016 à N026 et SEQ ID N031 à N033 d'une part, et  
10 aux sondes et amorces identifiées par SEQ ID N013 à N015, SEQ ID N027 à SEQ ID N030, et SEQ ID N034 à N037 d'autre part ; à titre d'exemple, le plus faible pourcentage d'identité observé entre les différents consensus généraux en acides nucléiques obtenus à partir de fragments d'ARN viral de MSRV-1, issu des lignées LM7PC et PLI-2 selon un  
15 protocole détaillé plus loin, est de 67% dans la région décrite à la figure 2,

- tout fragment nucléotidique est dit équivalent ou dérivé d'un fragment de référence, s'il présente une séquence nucléotidique équivalente à la séquence de  
20 référence ; selon la définition précédente, sont notamment équivalents à un fragment nucléotidique de référence :

a) tout fragment susceptible de s'hybrider au moins partiellement avec le complément du fragment de référence

25 b) tout fragment dont l'alignement avec le fragment de référence conduit à mettre en évidence des bases contigues identiques, en nombre plus important qu'avec tout autre fragment provenant d'un autre groupe taxonomique

30 c) tout fragment résultant ou pouvant résulter de la variabilité naturelle de l'espèce, à partir de laquelle il est obtenu

d) tout fragment pouvant résulter des techniques de génie génétique appliquées au fragment de référence

e) tout fragment, comportant au moins huit nucléotides contigus, codant un peptide homologue ou identique au peptide codé par le fragment de référence,

f) tout fragment différent du fragment de référence, par insertion, délétion, substitution d'au moins un monomère, extension, ou raccourcissement à l'une au moins de ses extrémités; par exemple tout fragment correspondant au fragment de référence flanqué à l'une au moins de ses extrémités par une séquence nucléotidique ne  
10 codant pas pour un polypeptide,

- par polypeptide, on entend notamment tout peptide d'au moins deux acides aminés, notamment oligopeptide, protéine, extrait, séparé, ou substantiellement isolé ou synthétisé, par l'intervention  
15 de la main de l'homme, notamment ceux obtenus par synthèse chimique, ou par expression dans un organisme recombinant,

- par polypeptide codé de manière partielle par un fragment nucléotidique, on entend un polypeptide présentant au moins 3 acides aminés codés par au moins 9  
20 monomères contigus compris dans ledit fragment nucléotidique,

- un acide aminé est dit analogue à un autre acide aminé, lorsque leur caractéristiques physico-chimiques respectives, telles que polarité,  
25 hydrophobicité, et/ou basicité, et/ou acidité, et/ou neutralité, sont sensiblement les mêmes; ainsi, une leucine est analogue à une isoleucine.

- tout polypeptide est dit équivalent ou dérivé d'un polypeptide de référence, si les polypeptides  
30 comparés ont sensiblement les mêmes propriétés, et notamment les mêmes propriétés antigéniques, immunologiques, enzymologiques et/ou de reconnaissance moléculaire ; est notamment équivalent à un polypeptide de référence :

a) tout polypeptide possédant une séquence dont au moins un acide aminé a été substitué par un acide aminé analogue,

b) tout polypeptide ayant une séquence peptidique équivalente, obtenue par variation naturelle ou induite dudit polypeptide de référence, et/ou du fragment nucléotidique codant pour ledit polypeptide,

c) un mimotope dudit polypeptide de référence,

d) tout polypeptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice versa,

e) tout polypeptide dans la séquence duquel on a introduit une modification des chaînes latérales des acides aminés, telle que par exemple une acétylation des fonctions amines, une carboxylation des fonctions thiol, une estérification des fonctions carboxyliques,

f) tout polypeptide dans la séquence duquel une ou des liaisons peptidiques ont été modifiées comme par exemple les liaisons carba, rétro, inverso, rétro-inverso, réduites, et méthylène-oxy.

(g) tout polypeptide dont au moins un antigène est reconnu par un antigène du polypeptide de référence,

- le pourcentage d'identité caractérisant l'homologie de deux fragments peptidiques comparés est selon la présente invention d'au moins 50% et de préférence au moins 70%.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse (MSRV-1).

Etant donné que l'agent pathogène et/ou infectant (MSRV)-2 a été détecté tant en ADN qu'en ARN dans les cellules infectées, il peut également être caractérisé sous forme d'ADN ou ARN.

Les expressions d'ordre utilisées dans la présente description et les revendications, telles que "première séquence nucléotidique" ne sont pas retenues pour exprimer un ordre particulier, mais pour définir plus  
5 clairement l'invention.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures annexées dans lesquelles:

- la figure 1 représente la séquence de type  
10 MSRV-2A obtenue à partir des cultures LM7 selon le protocole de Shih, (33) ; cette séquence est identifiée sous la référence SEQ ID N010,

- la figure 2 représente des consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B amplifiées par  
15 la technique PCR dans la région "pol", à partir d'ADN viral issu des lignées LM7PC et PLI-2, identifiés sous les références SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06, et le consensus commun avec amorces d'amplification portant la référence SEQ ID N07,

20 - la figure 3 représente l'arbre phylogénétique des séquences de type MSRV-1B obtenues par PCR dans la région "pol" définie par Shih (33),

- la figure 4 donne la définition d'une trame de lecture fonctionnelle pour chaque famille de type MSRV-  
25 1B/"PCR pol", lesdites familles A à D étant définies respectivement par les séquences nucléotidiques SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06, décrites à la figure 2,

- la figure 5 donne un exemple de consensus des  
30 séquences de MSRV-2B, identifié par SEQ ID N011,

- la figure 6 est une représentation de l'activité transcriptase inverse (RT) en dpm (désintégration par minute), dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des  
35 virions produits par les lymphocytes B en culture d'un patient atteint de SEP,

- 5       - la figure 7 donne, dans les mêmes conditions qu'à la figure 6, le dosage de l'activité transcriptase inverse dans la culture d'une lignée de lymphocytes B obtenue à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques,
- la figure 8 représente la séquence nucléotidique du clone PSJ17 (SEQ ID N09)
- la figure 9 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N08, du clone dénommé M003-P004,
- 10       - la figure 10 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N02 du clone F11-1; la partie repérée entre deux flèches dans la région de l'amorce correspond à une variabilité imposée par le choix de l'amorce ayant servi au clonage de F11-1; sur cette même figure, la
- 15       traduction en acides aminés est représentée,
- la figure 11 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N01, et une trame fonctionnelle de lecture possible en acides aminés de SEQ ID N01; sur cette séquence, les séquences consensus des transcriptases
- 20       inverses rétrovirales sont soulignées,
- la figure 12 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N012 du clone dénommé MSRV2EL1,
- la figure 13 décomposée en trois planches successives 13/18 à 15/18 représente la traduction en
- 25       acides aminés de SEQ ID N012, incluant l'amorce SEQ ID N013, selon 6 trames de lecture possibles,
- la figure 14 présente un alignement de la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010) sur la séquence MSRV2-EL1 (SEQ ID N012); sur cette même représentation, la région
- 30       d'hybridation de l'amorce identifiée sous la référence SEQ ID N013, (hormis la queue de clonage) est encadrée; celle de l'amorce identifiée sous la référence SEQ ID N014, est signalée entre des crochets,
- la figure 15 donne les résultats d'une PCR,
- 35       sous forme de photographie sous lumière ultra-violette d'un gel d'agarose imprégné de bromure d'éthidium, des

produits d'amplification obtenus à partir des amorces identifiées par SEQ ID N014 et SEQ ID N015,

- les figures 16 et 17 donnent les résultats d'une PCR, sous forme de photographie sous lumière ultraviolette d'un gel d'agarose imprégné de bromure d'éthidium, des produits d'amplification obtenus à partir des amorces identifiées par SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, et SEQ ID N019.

- la figure 18 donne une représentation matricielle de l'homologie entre SEQ ID N01 de MSRV-1 et celle d'un rétrovirus endogène dénommé HSERV9 ; cette homologie d'au moins 65% est mise en évidence par un trait plein, l'absence de trait signifiant une homologie inférieure à 65%.

15

EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES MSRV-2 DENOMMES MSRV-2A, PAR AMPLIFICATION DES REGIONS CONSERVEES DES GENES D'ADN-POLYMERASES ARN-DEPENDANTES, SUR UNE PREPARATION D'AGENT INFECTANT PURIFIE A PARTIR DE CULTURE DE CELLULES DE LA LIGNEE LM7

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une technique PCR (33) qui permet d'amplifier une région relativement conservée du gène pol des rétrovirus exogènes et endogènes, mais aussi des virus codant pour une enzyme à activité transcriptase inverse (RT) tels que notamment le virus de l'hépatite B et, implicitement, de tout gène d'ADN polymérase ARN dépendante ou d'enzyme, présentant des homologies de séquences suffisantes dans les régions définies par les amorces d'amplification utilisées. Cette technique PCR a été utilisée sur les acides nucléiques extraits d'une préparation d'agent infectant purifiée, obtenue selon le protocole (34) à partir des surnageants de la culture LM7 d'origine (24) gardés congelés à -80°C depuis lors. Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont reprises dans un volume d'un tampon contenant du thiocyanate de guanidine (35) et sont

30  
35

stockées à -80°C jusqu'à extraction des acides nucléiques selon la technique décrite par P.Chomzynski (35).

Préalablement à la réaction PCR, l'ARN de l'échantillon a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) avec des amorces dites "random" (hexanucléotides en mélange) à l'aide du Kit "cDNA synthesis system plus" (Amersham), selon les instructions du fabricant et en se basant sur une valeur approximée à un log près de la quantité d'ARN présente dans l'échantillon.

10 L'ADN obtenu après amplification PCR de l'ADNc, a été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning® (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION  
15 BUFFER", 2 µl de "PCR<sup>TM</sup> VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning®. A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes ont été  
20 repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (36). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les  
25 plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du "TA cloning  
30 kit". La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé  
35 avec l'appareil "Automatic Sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.



Les séquences obtenues ont ensuite été analysées à l'aide des logiciels Mac Vector® et Geneworks® sur banque de données informatiques Genebank®, pour les séquences nucléiques, et Swiss Prot®, pour les séquences

5 en acides aminés déduites des trames de lecture mises en évidence dans les séquences nucléiques. L'analyse des séquences obtenues à partir de l'échantillon viral provenant des surnageants LM7 décongelés, et purifié au

10 pic d'activité transcriptase inverse sur gradient de saccharose, a mis en évidence une population majoritaire de clones (environ 42% des clones), relativement à la représentativité individuelle des autres séquences (toujours inférieure à 5%, voire 10% pour un petit

15 nombre), et présentant des homologies partielles avec des rétrovirus connus dans la région "pol" attendue. Ce clone est dénommé MSRV2-A et identifié par SEQ ID N010 (Cf. Fig. 1). La région amplifiée entre les amorces PCR est homologue à la séquence correspondante MSRV2-B

20 identifiée par SEQ ID N011 (Cf. Fig. 5), décrite dans l'exemple 2. Les différences observées dans les séquences situées au niveau des amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange, utilisées

25 dans des conditions techniques différentes. L'interrogation de la banque de données Genebank® actualisée à ce jour n'a pas permis de mettre en évidence une séquence identique ou présentant des homologies significatives.

Cette séquence est présentée dans la figure 1. Elle présente un cadre de lecture ouvert en phase avec les

30 deux amorces PCR retrouvées aux extrémités, mais elle est plus courte que l'ensemble des séquences rétrovirales connues dans la région attendue entre ces amorces. Une délétion de 45 paires de bases (15 acides aminés) y est observée à la suite de la séquence de l'amorce amont alors

35 que les séquences précédant l'amorce aval sont présentes. Cependant la trame de lecture est ouverte et ininterrompue

sur toute la séquence incluant les amorces et la séquence en acides aminés déduite présente une homologie significative avec la région correspondante des rétrovirus connus. Dans la séquence interne aux amorces PCR, les  
5 acides aminés Glu, Arg, Gln, Pro et Asp, normalement assez bien conservés dans cette région pol des rétrovirus et des virus avec activité transcriptase inverse connus (33) sont retrouvés conservés aux bonnes positions dans la trame de lecture de la séquence originale.

10 Enfin, étant donné que cette séquence est suffisamment divergente des séquences rétrovirales déjà décrites dans les banques de données, on peut avancer qu'il s'agit d'une séquence appartenant à un nouvel agent infectant et/ou pathogène, dénommé MSRV-2A. Cet agent  
15 s'apparente à priori, d'après l'analyse des séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il peut aussi s'agir d'un virus à ARN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse  
20 comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (33). De plus, le caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés  
25 dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant d'un agent pathogène et/ou co-infectant procaryote ou eucaryote (protiste).

EXEMPLE 2: OBTENTION DE CLONES DENOMMES MSRV-1B  
30 ET MSRV-2B, DEFINISSANT RESPECTIVEMENT UN RETROVIRUS MSRV-1 ET UN AGENT CO-INFECTANT MSRV2, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS, SUR DES PREPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7PC ET PLI-2

35 Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih (33) a été utilisée. Cette technique permet, par

traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc synthétisé à partir d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN. En effet, la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih (33), a été utilisée sur un ADNc synthétisé à partir des acides nucléiques de fractions de particules infectantes purifiées sur gradient de saccharose selon la technique décrite par H. Perron (34) à partir de l'isolat "POL-2" (ECACC n°V92072202) produit par la lignée PLI-2 (ECACC n°92072201) d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG (ECACC n°V93010816) produit par la lignée LM7PC (ECACC n°93010817) d'autre part. Ces cultures ont été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet des demandes de brevet publiées sous les n° WO 93/20188 et WO 93/20189.

Après clonage avec le TA Cloning Kit® des produits amplifiés par cette technique et analyse de la séquence à l'aide du séquenceur automatique selon ce qui est décrit dans l'exemple 1, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version disponible de la banque de données Genbank®.

Les séquences clonées et séquencées à partir de ces échantillons correspondent notamment à deux types de séquences: un premier type de séquence, retrouvé dans la majorité des clones (55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) qui correspond à une famille de

séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9, et un second type de séquence qui correspond à des séquences très fortement homologues à la séquence attribuée à un agent infectant et/ou pathogène dénommé précédemment MSRV-2.

Le premier type de séquences représentant la majorité des clones est constituée de séquences dont la variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 (37), ou comme le résultat de l'interférence avec plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices. Ces éléments endogènes plus ou moins défectifs sont sensibles aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par un provirus répliatif, puisqu'ils appartiennent à la même famille de rétrovirus endogènes (38). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce rétrovirale dont on a obtenu en culture la génération de quasi-espèces, et qui contient un consensus des séquences décrites ci-dessous est dénommée MSRV-1B.

Dans la figure 2 sont présentées les consensus généraux des séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience, ces séquences étant respectivement identifiées par SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06. Ces séquences présentent une homologie en acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données Genbank®. L'arbre phylogénétique de ces séquences est présenté dans la figure 3. Dans cette figure, les sous-familles A, B, C, D représentent les séquences qui ont été retrouvées de manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les échantillons d'ARN pur de virions purifiés à partir des isolats MS7PG et POL-2. A partir de ces

familles de séquences, quatre séquences nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène, ou de différentes sous-familles d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 4, avec la traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionnelle existe pour chaque sous-famille de ces séquences MSRV-1B, et l'on peut voir que la trame de lecture ouverte fonctionnelle correspond à chaque fois à la séquence en acides aminés venant en deuxième ligne sous la séquence en acide nucléiques. Le consensus général de la séquence MSRV-1B, identifié par SEQ ID N07 et obtenu par cette technique PCR dans la région "pol" est présenté dans la figure 2.

Le deuxième type de séquence représentant la majorité des clones séquencés est représenté par la séquence MSRV-2B présentée dans la figure 5 et identifiée par SEQ ID N011. La région amplifiée entre les amorces PCR est homologue à une base près à la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010 selon Fig.1) interne aux amorces PCR décrite dans l'Exemple 1. Les différences observées dans les séquences correspondant aux amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange utilisées dans des conditions techniques différentes.

Les séquences MSRV-2A (SEQ ID N010) et MSRV-2B (SEQ ID N011) sont à l'évidence homologues, voire identiques, issues du même organisme et suffisamment divergentes des séquences rétrovirales déjà décrites dans les banques de données pour qu'on puisse avancer qu'il s'agit d'une région de séquence appartenant à un nouvel agent infectant, dénommé MSRV-2. Cet agent infectant s'apparenterait a priori, d'après l'analyse des premières séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il pourrait aussi s'agir d'un virus à ADN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité

transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (33). De plus, le caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir  
5 permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant d'un agent pathogène et/ou co-infectant prokaryote ou eukaryote (protiste).

10

EXEMPLE 3: OBTENTION DE CLONES DENOMMES MSRV-1B ET MSRV-2B, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1 et MSRV2, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS, SUR DES PREPARATIONS DE LYMPHOCYTES B D'UN  
15 NOUVEAU CAS DE SEP

La même technique PCR modifiée d'après la technique de Shih (33) a été utilisée pour amplifier et séquencer le matériel nucléaire ARN présent dans une fraction de virions purifiée au pic d'activité  
20 transcriptase inverse "de type LM7", sur gradient de saccharose selon la technique décrite par H. Perron (34), et selon les protocoles mentionnés dans l'exemple 2, à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un  
25 patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV), après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine dans un milieu de culture approprié contenant une concentration appropriée de cyclosporine A. Une représentation de l'activité transcriptase inverse dans  
30 les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions produits par cette lignée est présentée dans la figure 6. De même, les surnageants de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques ont été  
35 traités dans les mêmes conditions, et le dosage de l'activité transcriptase inverse dans les fractions du

gradient de saccharose s'est avéré négatif partout (bruit de fond) et est présenté dans la figure 7. La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de SEP et la même fraction sans activité transcriptase inverse du gradient 5 témoin non-SEP, ont été analysées par la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih (33), suivie des mêmes étapes de clonage et de séquençage tels que décrites dans les exemples 1 et 2.

Il est tout à fait notable que les séquences de 10 type MSRV-1 et MSRV-2 soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) 15 dans 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de type Mo-MuLV provenant de la transcriptase inverse commerciale utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADNc et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce 20 témoin, du fait de l'amplification "consensus" des séquences de polymérases homologues que réalise cette technique PCR. De plus, l'absence de cible concentrée qui fait compétition pour la réaction d'amplification dans l'échantillon témoin permet l'amplification de 25 contaminants dilués. La différence de résultats est à l'évidence hautement significative ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ).

EXEMPLE 4: OBTENTION D'UN CLONE PSJ17, DEFINISSANT UN RETROVIRUS MSRV-1, PAR REACTION DE 30 TRANSCRIPTASE INVERSE ENDOGENE SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE PLI-2.

Cette approche vise à obtenir des séquences d'ADN rétrotranscrites à partir de l'ARN supposé rétroviral dans l'isolat, en utilisant l'activité transcriptase inverse 35 présente dans ce même isolat. Cette activité transcriptase inverse ne peut théoriquement fonctionner qu'en présence

d'un ARN rétroviral, lié à un ARNt amorce ou hybridé à des brins courts d'ADN déjà rétro-transcrits dans les particules rétrovirales (39). Ainsi l'obtention de séquences rétrovirales spécifiques dans un matériel  
5 contaminé par des acides nucléiques cellulaires, a été optimisée selon ces auteurs grâce à l'amplification enzymatique spécifique des portions d'ARN viraux par une activité transcriptase inverse virale. Les auteurs ont pour cela, déterminé les conditions physico-chimiques  
10 particulières dans lesquelles cette activité enzymatique de transcription inverse sur des ARN contenus dans des virions pouvait être effective in vitro. Ces conditions correspondent à la description technique des protocoles présentés ci-dessous (réaction de RT endogène,  
15 purification, clonage et séquençage).

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une préparation de virion concentré, mais non purifié, obtenu à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2 préparés selon la méthode suivante : les surnageants de  
20 culture sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un  
25 coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virion concentré, mais non purifié. Cet  
30 échantillon viral concentré mais non purifié a été utilisé pour effectuer une réaction dite de transcription inverse endogène, telle que décrite ci-après : un volume de 200 µl de virion purifié selon le protocole décrit ci-dessus et contenant une activité transcriptase inverse d'environ 1-5  
35 millions de dpm est décongelé à 37°C jusqu'à apparition d'une phase liquide, puis placé sur de la glace. Un tampon



5 fois concentré a été préparé avec les composants suivants: Tris-HCl pH 8,2, 500 mM; NaCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 25 mM; DTT 75 mM et NP 40 0,10 %. 100 µl de tampon 5X + 25 µl d'une solution de dATP 100mM + 25 µl d'une solution de dTTP 100 mM + 25 µl d'une solution de dGTP 100 mM + 25 µl d'une solution de dCTP 100 mM + 100 µl d'eau distillée stérile + 200 µl de la suspension de virions (activité T.I. de 5 millions de DPM) dans le PBS ont été mélangés et incubés à 42°C pendant 3 heures. Après cette incubation le mélange réactionnel est directement ajouté à un mélange tamponné phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803); la phase aqueuse est collectée et un volume d'eau distillée stérile est ajouté à la phase organique pour ré-extraire le matériel nucléaire résiduel. Les phases aqueuses collectées sont regroupées et les acides nucléiques contenus sont précipités par addition d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 au 1/10 de volume + 2 volumes d'éthanol + 1 µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) et mise à -20°C de l'échantillon pendant 4h ou la nuit à +4°C. Le précipité obtenu après centrifugation est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70% et resuspendu dans 60 ml d'eau distillée. Les produits de cette réaction ont ensuite été purifiés, clonés et séquencés selon les protocole décrit ci-après: des ADN bouts francs avec des adénines non-appariées aux extrémitées ont été générés: une réaction de "remplissage" a d'abord été effectuée: 25 µl de la solution d'ADN précédemment purifiée ont été mélangés avec 2 µl d'une solution 2,5 mM contenant, en quantité équimolaire, dATP + dGTP + dTTP + dCTP / 1 µl d'ADN polymérase T4 (Boehringer-Mannheim ref. 1004 786) / 5 µl de 10X "incubation buffer for restriction enzyme" (Boehringer-Mannheim ref. 1417 975) / 1 µl d'une solution à 1% de sérum-albumine bovine / 16 µl d'eau distillée stérile. Ce mélange a été incubé 20 minutes à 11°C. 50 µl de tampon TE et 1 µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) y ont été ajoutés avant extraction des

acides nucléiques avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803), et précipitation à l'acétate de sodium comme décrit précédemment. L'ADN précipité après centrifugation est resuspendu dans 10  $\mu$ l de tampon 10 mM Tris pH 7,5. Puis, 5  $\mu$ l de cette suspension ont été mélangés avec 20  $\mu$ l de tampon Taq 5X, 20  $\mu$ l de 5mM dATP, 1  $\mu$ l (5U) de Taq ADN polymérase (Amplitaq<sup>TM</sup>) et 54  $\mu$ l d'eau distillée stérile. Ce mélange est incubé 2 h à 75°C avec un film d'huile à la surface de la solution. L'ADN en suspension dans la solution aqueuse prélevée en dessous du film d'huile après incubation est précipité comme décrit précédemment et resuspendu dans 2  $\mu$ l d'eau distillée stérile. L'ADN obtenu a été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning<sup>TM</sup>. Les 2  $\mu$ l de solution d'ADN ont été mélangés avec 5  $\mu$ l d'eau distillée stérile, 1  $\mu$ l d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2  $\mu$ l de "PCR<sup>TM</sup> VECTOR" (25 ng/ml) et 1  $\mu$ l de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (36). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA cloning kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems,

ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "Automatic Sequencer, modèle 373 A" Applied Biosystems, selon les instructions du fabricant.

L'analyse discriminante sur les banques de données informatiques des séquences clonées à partir des fragments d'ADN présents dans le mélange réactionnel a permis de mettre en évidence une séquence de type rétroviral. Le clone correspondant PSJ17 a été entièrement séquencé et la séquence obtenue, présentée dans la figure 8 et identifiée apr SEQ ID N09, a été analysée à l'aide du logiciel "Geneworks®" sur les banques de données actualisées "Genebank®". L'analyse des banques de données n'a pas permis de trouver de séquence identique déjà décrite. Seule une homologie partielle a pu être retrouvée avec certains éléments rétroviraux connus. L'homologie relative la plus intéressante concerne un rétrovirus endogène dénommé ERV-9, ou HSERV-9, selon les références (40).

**EXEMPLE 5: AMPLIFICATION PCR DE LA SEQUENCE NUCLEIQUE CONTENUE ENTRE LA REGION 5' DEFINIE PAR LE CLONE "POL MSRV-1B" ET LA REGION 3' DEFINIE PAR LE CLONE PSJ17.**

Cinq oligonucléotides, M001, M002-A, M003-BCD, P004 et P005, ont été définis pour amplifier de l'ARN provenant de virions purifiés POL-2. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau). L'amplification consiste en une étape de RT-PCR selon le protocole décrit dans l'Exemple 2, suivie d'une PCR "nichée" selon le protocole PCR décrit dans le document EP-A-0569272. Dans le premier cycle RT-PCR, les amorces M001 et P004 ou P005 sont utilisées. Dans le deuxième cycle PCR, les amorces M002-A ou M003-BCD, et l'amorce P004 sont utilisées. Les amorces sont positionnées comme suit:

M002-A

M003-BCD

M001

P004

P005

5 \_\_\_\_\_ ARN

POL-2

**<----->**

<----->

pol MSRV-1

PSJ17

Leur composition est:

- 10 amorce M001: GGTCITICCAIGG (SEQ ID N020)  
amorce M002-A: TTAGGGATAGCCCTCATCTCT (SEQ ID N021)  
amorce M003-BCD: TCAGGGATAGCCCCATCTAT (SEQ ID N022)  
amorce P004: AACCCCTTGCCACTACATCAATTT (SEQ ID N023)  
amorce P005: GCGTAAGGACTCCTAGAGCTATT (SEQ ID N024)

- 15 Le produit d'amplification "nichée" obtenu et  
dénommé M003-P004 est présenté dans la figure 9, et  
correspond à la séquence SEQ ID N08.

EXEMPLE 6: AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION  
DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA  
20 IDENTIFIEE, DANS UN ECHANTILLON DE VIRUS PURIFIE AU PIC  
D'ACTIVITE TRANSCRIPTASE INVERSE

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Frohman (41) a été utilisée. La technique dérivée permet, à l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du génome à analyser. Cette variante technique est décrite dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories Inc., (Palo-Alto California, USA) fournie avec son produit "5'-AmpliFINDER™ RACE Kit", qui a été utilisé sur une fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

Les amorces 3' spécifiques utilisées dans le protocole du kit pour la synthèse du cDNA et l'amplification PCR sont respectivement complémentaires aux séquences MSRV-1 suivantes:

- 35 cDNA : TCATCCATGTACCGAAGG (SEQ ID N025)  
amplification : ATGGGGTTCCCAAGTTCCT (SEQ ID N026)

Les produits issus de la PCR ont été purifiés après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (36), puis resuspendus dans 10 ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning<sup>TM</sup> (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "PCR<sup>TM</sup> VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning<sup>®</sup> (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (36). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit<sup>®</sup>. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A" Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virion purifié comme décrit ci-après, sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la

lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour  
5 éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T)  
10 pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50%  
15 poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 trs/min (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique  
20 décrite par H. Perron (24). Les fractions contenant le pic d'activité RT "de type LM7" sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 trs/min (100 000g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virion purifié ainsi obtenu est alors  
25 repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'extraction d'ARN. La réaction de synthèse de cDNA mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN extrait de virion extracellulaire purifié. L'amplification PCR selon la technique citée plus-haut a permis d'obtenir le clone  
30 F1-11 dont la séquence identifiée par SEQ ID N02, est présentée dans la figure 10.

Ce clone permet de définir, avec les différents clones préalablement séquencés, une région représentative du gène "pol" du rétrovirus MSRV-1, telle que présentée  
35 dans la figure 11. Cette séquence dénommée SEQ ID N01 est reconstituée à partir de différents clones se recouvrant à

leurs extrémités, en corrigeant les artéfacts liés aux amorces et aux techniques d'amplification ou de clonage, qui interrompraient artificiellement la trame de lecture de l'ensemble.

5 Dans la figure 11, la trame de lecture potentielle avec sa traduction en acides aminés est présentée en dessous de la séquence en acides nucléiques.

EXEMPLE 7: CAPTURE, AMPLIFICATION ET CLONAGE  
10 D'UNE PORTION DU GENOME MSRV-2 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA IDENTIFIEE, DANS UNE CULTURE INFECTEE PAR MSRV-2

Les surnageants d'une culture cellulaire exprimant une activité transcriptase inverse "de type LM7" similaire à celle décrite par H. Perron (24) ont été  
15 collectés régulièrement pendant plusieurs semaines et conservés congelés à -80°C après addition de 10% de glycérol. L'ensemble des surnageants a ensuite été décongelé afin de concentrer les particules infectantes par ultracentrifugation et de les purifier par  
20 centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose; l'activité transcriptase inverse a ensuite été mesurée dans les différentes fractions collectées sur le gradient selon la méthodologie décrite par H. Perron (34).

Les différentes fractions représentant le pic  
25 d'activité transcriptase inverse ont été regroupées afin d'en extraire les acides nucléiques selon un protocole destiné à la purification d'ARN (35), mais les acides nucléiques extraits n'ont pas été traités par la DNase. Une amplification PCR dérivée de la technique décrite par  
30 Shih (33) a été effectuée directement sur cet échantillon d'acides nucléiques non traité par la DNase, selon un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans le document EP-A-0 569 272, dans un volume total de 100 µl, contenant 200 ng d'ARN, 1 µl d'ARN Guard, 33 µmoles de  
35 chaque mélange d'amorces (MOP) décrits par Shih (33), et identiques à ceux utilisés pour la PCR (ADN) directe ;

0,25 mM de chaque dNTP, 10  $\mu$ l de tampon 10X, 2,5 u d'enzyme Tag et 0,4  $\mu$ l d'enzyme RT (RT-AMV; 10u) sont aussi ajoutés aux échantillons. Les cycles d'amplification sont réalisés comme suit: dénaturation de l'ARN  
5 65°C/10 minutes, synthèse de l'ADNc 50°C/8 minutes, puis les cycles sont identiques à ceux de la PCR décrite par Shih (33). Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler l'absence de contaminants (réaction sur de l'eau). Les produits ont été analysés sur gel  
10 d'acrylamide 10%.

Les échantillons amplifiés par RT-PCR ont ensuite été clonés et séquencés selon les techniques décrites dans l'exemple 1.

La majorité des clones séquencés à partir du  
15 produit de RT-PCR correspond à la séquence MSRV-2A et à son équivalente MSRV-2B précédemment décrites dans les exemples 1 à 3.

Par ailleurs, après élimination des séquences  
artéfactuelles, il s'avère que les autres clones séquencés  
20 correspondent à des séquences de type MSRV-1 telles que décrites dans les exemples 1 à 3.

Après la vérification des séquences présentes dans ce matériel nucléaire provenant de ces fractions purifiées contenant des particules infectantes dont au  
25 moins une partie est associée à une activité transcriptase inverse, le matériel nucléaire restant a été utilisé pour effectuer une capture spécifique des acides nucléiques portant la séquence MSRV2 préalablement identifiée et décrite dans les exemples 1 à 3.

30 Dans une étape préalable, le matériel génétique portant la séquence MSRV2 a été amplifié par une technique PCR monodirectionnelle de 50 cycles à l'aide d'une seule amorce. Cette amorce est couplée à une molécule de biotine à son extrémité 3', permet l'amplification  
35 monodirectionnelle de 3' vers 5' et correspond à la séquence suivante identifiée sous SEQ ID N038 :



5' TAAAGATCTAGAATTCGGCTATAGGCGGCATCCGGCAACT 3'

Ensuite, la capture a été effectuée en solution avec des billes magnétiques couplées à l'avidine (Dynabeads®) selon les instructions du fabricant (Dynal) et, après une série de lavages à température ambiante permettant d'éliminer les acides nucléiques non couplés à une biotine, une PCR a été effectuée directement sur ces billes lavées avec une amorce spécifique en 3' et une amorce en 5' apportée par une solution d'oligonucléotide de 10 bases (10 mer) avec une séquence aléatoire.

L'amorce d'amplification spécifique orientée de 3' vers 5' correspond à la séquence identifiée par SEQ ID N013:

5' GCATCCGGCAACTGCACG 3'

La PCR effectuée à 35°C sur 40 cycles avec ces amorces a permis d'amplifier le matériel génétique spécifiquement biotinilé par la première étape de PCR et capturé sur les billes Dynabeads®. Après clonage avec le kit "TA cloning" de l'ADN amplifié par cette seconde étape de PCR et séquençage des clones recombinants, selon les techniques décrites dans l'Exemple 1, une séquence de 748 paires de bases a été obtenue. Cette séquence d'acides nucléiques SEQ ID N012 est présentée dans la figure 12. Cette séquence élonguée sera dénommée ensuite MSRV-2EL1.

La séquence inverse complémentaire de l'amorce SEQ ID N013 est présente à l'extrémité 3' et est encadrée sur la figure 12. En amont de cette amorce, on retrouve la séquence déjà identifiée dans les clones MSRV-2A et MSRV-2B.

La traduction en acide aminés de cette séquence selon les 6 trames de lectures possibles est présentée dans la figure 13.

Un alignement de la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010) sur la séquence MSRV-2EL1 (SEQ ID N012) est présenté dans la figure 14. On note que la séquence MSRV-2A est rigoureusement identique à la séquence élonguée,

hormis quelques différences dans la région correspondant aux amorces dégénérées utilisées pour obtenir MSRV-2A. Cette région est soulignée dans cette figure ; par ailleurs, la région d'hybridation de l'amorce SEQ ID N013, 5 (hormis la queue de clonage) est encadrée, celle de l'amorce SEQ ID N014 est présentée entre crochets. La séquence réelle du génome MSRV-2 dans cette région est vraisemblablement celle de MSRV-2EL1, où elle n'a pas été imposée par des amorces hybridées à basse stringence comme 10 c'est le cas pour MSRV-2A (et MSRV-2B de même).

La séquence MSRV-2EL1 correspond donc à une nouvelle région séquencée du génome MSRV-2. Ceci a été vérifié à l'aide de nouvelles amorces PCR définies dans MSRV-2EL1 et MSRV-2A qui ont permis une amplification 15 spécifique sur les acides nucléiques utilisés pour le clonage décrit dans cet exemple.

Les exemples suivants présentent différents résultats d'amplifications spécifiques MSRV2 qui confirment la relation avec la présence d'agent infectant 20 correspondant dans les cultures cellulaires décrites, pour permettre l'isolement d'un virus de type LM7 (24) et, aussi, in vivo, chez les patients atteints de SEP.

Le résultat d'interrogation de la banque de donnée Genbank®, actualisée en août 1994, avec la 25 séquence MSRV-2EL1 ne montre aucune homologie significative avec des séquences génétiques connues à ce jour. Cependant, l'interrogation des traductions possibles en acides aminés selon les 6 trames de lecture potentielles de cette séquence MSRV-2EL1, montre des 30 homologues partielles avec des séquences bactériennes, virales ou cellulaires.

L'absence d'amplification PCR avec des amorces spécifiques sur de l'ADN humain normal montre qu'il ne s'agit pas d'une séquence d'origine cellulaire. MSRV-2 est 35 donc un agent infectant exogène à l'homme. Cependant, la nature dégénérée des mélanges d'amorces, utilisées selon

des variantes de la technique décrite par Shih (33), qui ont permis l'identification des premiers éléments de séquence dénommés MSRV-2A et MSRV-2B, peut avoir permis l'amplification imprévue d'un génome n'appartenant pas à un rétrovirus, ni même à un gène codant pour une ADN-polymérase ARN-dépendante. La co-détection quasi-systématique de MSRV-1 dans les cultures provenant de SEP et exprimant une activité transcriptase inverse peut s'expliquer par une association pathologique entre deux agents différents dont l'un au moins est un rétrovirus (MSRV-1).

La détection chez les malades de ces deux types de séquences décrite dans les exemples suivants corrobore une association pathologique. Cependant un seul de ces éléments peut suffire à expliquer la pathologie induite dans la SEP.

**EXEMPLE 8: DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES MSRV-2 DANS DIFFERENTS ECHANTILLONS DE CELLULES HUMAINES PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE SEP OU DE TEMOINS**

La séquence MSRV-2EL1 (SEQ ID N012) a permis de définir plusieurs couples d'amorces oligonucléotidiques utilisables pour l'amplification d'ADN ou d'ARN spécifique par la technique PCR.

Les amorces définies ci-après ont permis de réaliser une détection spécifique du génome MSRV-2 dans différentes cellules humaines, par une étape de RT-PCR selon un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans le document EP-A-0 569 272.

Les amorces utilisées sont les suivantes:

- amorce 5', identifiée par SEQ ID N014

5'GTAGTTCGATGTAGAAAGCG 3'

- amorce 3', identifiée par SEQ ID N015

5'GCATCCGGCAACTGCACG 3'

La PCR est effectuée selon une succession de 35 cycles enchaînant, après l'étape de synthèse de l'ADNc, 1 min, à 94°C, 1 min, à 54°C et 1 min, à 72°C.

L'ARN total extrait de différents types de 5 cellules (35), sans traitement par la DNase, a été utilisé dans cette réaction RT-PCR.

Dans la figure 15, sont présentés les résultats de PCR à partir d'une photographie sous lumière ultra-violette d'un gel d'agarose imprégné de bromure 10 d'éthidium, dans lequel on a effectué une électrophorèse des produits d'amplification PCR déposés séparément dans les différents puits.

Le puits numéro 1 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN et les puits 2 à 9 15 représentent, dans l'ordre les produits amplifiés à partir des ARN totaux des cellules suivantes:

- 2- LM7PC (ECACC n°93010817);
- 3- PLI2 (ECACC n°92072201);
- 4- cellules de médulloblastome humain;
- 20 5- MRC-5 (Fibroblastes humains de poumons embryonnaires);
- 6- cellules mononuclées sanguines humaines de donneur sain;
- 7- cellules provenant d'un mélange de lignées 25 lymphoblastoïdes B dérivées du sang périphérique de différents patients atteints de SEP;
- 8- cellules provenant d'une lignée lymphoblastoïde B dérivée du sang périphérique d'un patient atteint de SEP;
- 30 9- témoin ne contenant pas d'acides nucléiques (témoin "eau").

On peut constater l'existence d'une bande d'ADN spécifique d'environ 700 paires de bases, correspondant à la taille attendue, amplifiée dans les échantillons 35 provenant de patients atteints de SEP (LM7PC, PLI2, lignées de lymphocytes B) et non dans les cellules testées

provenant des témoins non-atteints de SEP (MRC5, cellules mononuclées sanguines et médulloblastome).

EXEMPLE 9: DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES  
5 MSRV-1 et MSRV-2 DANS DIFFERENTS ECHANTILLONS DE PLASMA  
PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE SEP OU DE TEMOINS.

Une technique PCR analogue à celle décrite dans  
l'exemple 8 a été utilisée pour détecter les génomes  
MSRV-1 et MSRV-2 dans des plasmas obtenus après  
10 prélèvement de sang sur EDTA de patients atteints de SEP  
et de témoins non-SEP.

L'extraction des ARN de plasma a été effectuée  
selon la technique décrite par P. Chomzynski (35), après  
addition d'un volume du tampon contenant du guanidinium  
15 thiocyanate à 1 ml de plasma gardé congelé à -80°C après  
recueil.

Pour MSRV-2, la PCR a été effectuée dans les  
mêmes conditions et avec les mêmes amorces que celles  
décrites dans l'exemple 8.

20 Cependant des résultats similaires ont aussi été  
obtenus avec les amorces PCR suivantes dans deux  
amplifications successives par PCR "nichée" sur  
échantillons d'acides nucléiques non-traités par la DNase.

Les amorces utilisées pour cette première étape  
25 de 40 cycles avec une température d'hybridation de 48°C  
sont les suivantes:

-amorce 5', identifiée par SEQ ID N027

5' GCCGATATCACCCGCCATGG 3', correspondant à une  
amorce PCR MSRV-2 5', pour une première PCR sur  
30 prélèvement de patients,

-amorce 3', identifiée par SEQ ID N028

5' GCATCCGGCAACTGCACG 3', correspondant à une  
amorce PCR MSRV-2 3', pour une première PCR sur  
prélèvement de patients

35 Après cette étape, 10µl du produit  
d'amplification sont prélevés et utilisés pour réaliser

une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée. Cette deuxième étape se déroule sur 35 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 5 50°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

Les amorces utilisées pour cette deuxième étape sont les suivantes:

-amorce 5', identifiée par SEQ ID N029

5' CGCGATGCTGGTTGGAGAGC 3', correspondant à une  
10 amorce PCR MSRV-2 5', pour une PCR-nichée sur prélèvement de patients,

-amorce 3', identifiée par SEQ ID N030

5' TCTCCACTCCGAATATTCCG 3', correspondant à une  
amorce PCR MSRV-2 3', pour une PCR-nichée sur prélèvement  
15 de patients

Pour MSRV-1, l'amplification a été effectuée en deux étapes. De plus, l'échantillon d'acides nucléiques est préalablement traité par la DNase et un contrôle PCR sans RT (transcriptase inverse AMV) est effectué sur les  
20 deux étapes d'amplification, de manière à vérifier que l'amplification RT-PCR provient exclusivement de l'ARN MSRV-1. En cas de contrôle sans RT positif, l'échantillon aliquoté d'ARN de départ est à nouveau traité par la DNase et amplifié à nouveau.

25 Le protocole de traitement par la DNase dépourvue d'activité RNase est le suivant: l'ARN extrait est aliquoté en présence de "RNase inhibitor" (Boehringer-Mannheim) dans de l'eau traitée au DEPC à une concentration finale de 1 µg dans 10 µl; à ces 10 µl, est  
30 ajouté 1µl de "RNase-free DNase" (Boehringer-Mannheim) et 1,2 µl de tampon à pH 5 contenant 0,1 M/l d'acétate de sodium et 5 mM/l de MgSO<sub>4</sub>; le mélange est incubé 15 min. à 20°C et porté à 95°C pendant 1,5 min. dans un "thermocycler".

35 La première étape de RT-PCR MSRV-1 est effectuée selon une variante du procédé d'amplification d'ARN tel

que décrit dans la demande de brevet n° EP 0 569 272 A1. Notamment, l'étape de synthèse d'ADNc est effectuée à 42°C pendant une heure; l'amplification PCR se déroule sur 40 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 53°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

Les amorces utilisées pour cette première étape sont les suivantes:

-amorce 5', identifiée par SEQ ID N016

5' AGGAGTAAGGAAACCCAACGGAC 3'

10 -amorce 3', identifiée par SEQ ID N017

5' TAAGAGTTGCACAAGTGC 3'

Après cette étape, 10µl du produit d'amplification sont prélevés et utilisés pour réaliser une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée. Cette deuxième étape se déroule sur 35 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 53°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

Les amorces utilisées pour cette deuxième étape sont les suivantes:

-amorce 5', identifiée par SEQ ID N018

5' TCAGGGATAGCCCCCATCTAT 3'

-amorce 3', identifiée par SEQ ID N019

5' AACCCCTTTGCCACTACATCAATTT 3'.

25 Dans la figure 16, sont présentés les résultats de PCR sous forme de photographies sous lumière ultraviolette de gels d'agarose imprégnés de bromure d'éthidium, dans lesquels on a effectué une électrophorèse des produits d'amplification PCR déposés séparément dans les différents puits.

La photographie du haut représente le résultat de l'amplification spécifique MSRV-2:

le puits numéro 8 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN et les puits 1 à 7 35 représentent, dans l'ordre, les produits amplifiés à

partir des ARN totaux de plasmas provenant de 4 témoins sains exempts de SEP (puits 1 à 4) et de 3 patients atteints de SEP, à différents stades de la maladie (puits 5 à 7).

5 Dans cette série, du matériel nucléaire MSRV-2 est détecté dans le plasma d'un cas de SEP sur les 3 testés et dans aucun des 4 plasmas témoins. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

10 La photographie du bas représente le résultat de l'amplification spécifique par RT-PCR "nichée" MSRV-1:

le puits n°1 contient le produit PCR effectué avec de l'eau seule, sans addition de transcriptase inverse AMV; le puits n°2 contient le produit PCR effectué  
15 avec de l'eau seule, avec addition de transcriptase inverse AMV; le puits numéro 3 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN; les puits 4 à 13 contiennent, dans l'ordre, les produits amplifiés à partir des ARN totaux extraits de fractions de gradient de  
20 saccharose (collectées du haut vers le bas) sur lequel un culot de virion provenant d'un surnageant de culture infectée par MSRV-1 et MSRV-2 a été centrifugé à l'équilibre selon le protocole décrit par Perron (34); dans le puits 14 rien n'a été déposé; dans les puits 15 à  
25 17 on a déposé les produits amplifiés d'ARN extrait de plasmas provenant de 3 patients différents atteints de SEP, à différents stades de la maladie.

Le génome rétroviral MSRV-1 est bien retrouvé dans la fraction du gradient de saccharose contenant le  
30 pic d'activité transcriptase inverse mesurée selon la technique décrite par H. Perron (24), avec une très forte intensité (fraction 5 du gradient, déposée dans le puits n°8). Une légère amplification a eu lieu dans la première fraction (puits n°4) correspondant vraisemblablement à de  
35 l'ARN libéré par des particules lysées qui flottaient à la surface du gradient; de même, des débris aggrégés ont



sédimenté dans la dernière fraction (fond de tube) entraînant quelques copies de génome MSRV-1 qui ont donné lieu à une amplification de faible intensité.

Sur les 3 plasmas de SEP testés dans cette série, 5 l'ARN MSRV-1 a été retrouvé dans un cas, produisant une amplification très intense (puits n°17).

Dans cette série, le génome ARN rétroviral MSRV-1 correspondant vraisemblablement à des particules de virus extracellulaire présentes dans le plasma en nombre 10 extrêmement faible, a été détecté par RT-PCR "nichée" dans un cas de SEP sur les 3 testés. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

De plus, la spécificité des séquences amplifiées par ces techniques PCR peut être vérifiée et évaluée par 15 la technique "ELOS" telle que décrite par F. Mallet (42) et dans le document FR-2 663 040.

Pour MSRV-1 les produits de la PCR nichée sus-décrite peuvent être testés dans deux systèmes ELOS permettant de détecter séparément un consensus A et un 20 consensus B+C+D de MSRV-1, correspondant aux sous-familles décrites dans l'exemple 2 et les figures 2, 3 et 4. En effet, les séquences proches du consensus B+C+D sont retrouvées essentiellement dans les échantillons d'ARN provenant de virions MSRV-1 purifiés à partir de cultures 25 ou amplifiés dans des liquides biologiques extracellulaires de patients SEP, alors que les séquences proches du consensus A sont essentiellement retrouvées dans l'ADN cellulaire humain normal.

Le système ELOS/MSRV-1 pour la capture et 30 l'hybridation spécifique des produits PCR de la sous-famille A utilise un oligonucléotide de capture cpV1A avec une liaison amine en 5' et un oligonucléotide de détection biotinylé dpV1A ayant respectivement pour séquence:

- cpV1A identifié par SEQ ID N031

35 5' GATCTAGGCCACTTCTCAGGTCCAGS 3', correspondant à l'oligonucléotide de capture ELOS des produits PCR-nichée

MSRV-1 effectuée avec les amorces identifiées par SEQ ID N016 et SEQ ID N017, suivie éventuellement de l'amplification avec les amorces identifiées par SEQ ID N018 et SEQ ID N019 sur prélèvement de patients.

5 - dpV1A identifié par SEQ ID N032

5' CATCTITTTGGICAGGCAITAGC 3' correspondant à l'oligonucléotide de capture ELOSA de la sous-famille A des produits PCR-nested MSRV-1 effectuée avec les amorces identifiées par SEQ ID N016 et SEQ ID N017, suivie  
10 éventuellement de l'amplification avec les amorces identifiées par SEQ ID N018 et SEQ ID N019 sur prélèvement de patients.

Le système ELOSA/MSRV-1 pour la capture et l'hybridation spécifique des produits PCR de la sous-  
15 famille B+C+D utilise le même oligonucléotide de détection biotinylé dpV1A et un oligonucléotide de capture cpV1B avec une liaison amine en 5'ayant pour séquence:

- dpV1B identifié par SEQ ID N033

5' CTTGAGCCAGTTCTCATACCTGGA 3', correspondant à l'oligonucléotide de capture ELOSA de la sous-famille  
20 B + C + D des produits PCR-nested MSRV-1 effectuée avec les amorces identifiées par SEQ ID N016 et SEQ ID N017, suivie éventuellement de l'amplification avec les amorces identifiées par SEQ ID N018 et SEQ ID N019 sur prélèvement  
25 de patients.

Ce système de détection ELOSA a permis de vérifier qu'aucun des produits PCR ainsi amplifiés à partir de plasmas de patients SEP traités par la DNase ne contenait de séquence de la sous-famille A et que tous  
30 étaient positifs avec le consensus des sous-familles B, C et D.

Pour MSRV-2, une technique ELOSA similaire a été évaluée sur des isolats provenant de cultures cellulaires infectées en utilisant les amorces d'amplification PCR  
35 suivantes,

- amorce 5', identifiée par SEQ ID N034

5' AGTGYTRCCMCARGGCGCTGAA 3', correspondant à une  
amorce PCR MSRV-2 5', pour PCR sur prélèvement de  
cultures,

- amorce 3', identifiée par SEQ ID NO35

5 5' GMGGCCAGCAGSAKGTCATCCA 3', correspondant à une  
amorce PCR MSRV-2 3', pour PCR sur prélèvement de  
cultures,

et les oligonucléotides de capture avec une  
liaison amine en 5' cpV2, et de détection biotinylé dpV2,  
10 ayant pour séquences respectives:

-cpV2 identifiée par SEQ ID NO36

5 GGATGCCGCCTATAGCCTCTAC 3', correspondant à un  
oligonucléotide de capture ELOSA des produits de la PCR  
MSRV-2 effectuée avec les amorces SEQ ID NO34 et  
15 SEQ ID NO35, ou éventuellement avec les amorces dégénérées  
définies par Shih (33),

-dpV2 identifié par SEQ ID NO37

5' AAGCCTATCGCGTGCAGTTGCC 3', correspondant à un  
oligonucléotide de détection ELOSA des produits de la PCR  
20 MSRV-2 effectuée avec les amorces SEQ ID NO34 et  
SEQ ID NO35, ou éventuellement avec les amorces dégénérées  
définies par Shih (33)

Ce système d'amplification PCR avec un couple  
d'amorces différent de ceux qui ont été précédemment  
25 décrits pour l'amplification sur les échantillons de  
patients, a permis de confirmer l'infection par MSRV-2 de  
cultures in vitro et d'échantillons d'acides nucléiques  
utilisés pour les travaux de biologie moléculaire.

En fin de compte, nos premiers résultats de  
30 détection PCR du génome d'agents pathogènes et/ou  
infectants, il est vraisemblable que du "virus" libre peut  
circuler dans le flux sanguin de patients en phase de  
poussée aiguë, en dehors du système nerveux. Ceci est  
compatible avec l'existence quasi-systématique de  
35 "brèches" dans la barrière hémato-encéphalique des  
patients en phase active de SEP.

Il est ainsi déjà envisageable, grâce aux découvertes effectuées et aux méthodes mises au point par les inventeurs de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1 et/ou MSRV-2 et d'évaluer une thérapie dans la SEP sur la base de son efficacité à "négativer" la détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients. De plus, la détection précoce chez des personnes ne présentant pas encore de signes neurologiques de SEP, pourrait permettre d'instaurer un traitement d'autant plus efficace sur l'évolution clinique ultérieure qu'il précéderait le stade lésionnel qui correspond à l'apparition des troubles neurologiques. Or, à ce jour, un diagnostic de SEP ne peut être établi avant l'installation d'une symptomatologie neurologique lésionnelle et, donc, aucun traitement n'est instauré avant l'émergence d'une clinique évocatrice de lésions du système nerveux central déjà conséquentes. Le diagnostic d'une infection et/ou réactivation de MSRV-1 et/ou MSRV-2 chez l'homme est donc déterminant et la présente invention en fournit les moyens.

Il est ainsi possible, outre de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1 et/ou MSRV-2, d'évaluer une thérapie dans la SEP sur la base de son efficacité à "négativer" la détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Norrby E., Prog. Med. Virol., 1978; 24, 1-39
- (2) Johnson R.T., "Handbook of clinical neurology, 47  
5 Demyelinating diseases", Vinken P. et Bruyn G.W., eds.  
Amsterdam, Elsevier Science Publishing, 1985, 319-336
- (3) Cook 1980
- (4) Rosati 1988
- (5) Riisse 1991
- 10 (6) Elian 1990
- (7) Lisak R.P. et Zweiman B., New Engl. J. Med. 1977; 297,  
850-853
- (8) Lassmann H. et Wisniewski H.M., Arch. Neurol. 1979;  
36, 490-497
- 15 (9) Hirayama M. et coll, Neurology 1986; 36, 276-278
- (10) Kenneth G.W. et coll, Annals of Neurology 1986; 20,  
20-25
- (11) Suzumura A. et coll, Journal of Neuroimmunology 1986;  
11, 137-147
- 20 (12) Tourtelotte W. et coll, Journal of Neurochemistry  
1986; 46, 1086-1093
- (13) Field E.J., The Lancet 1989, I, 1272
- (14) Fujinami R.S. et Oldstone M.B.A., "Molecular mimicry:  
Cross-reactivity between microbes and host proteins as a  
25 cause of autoimmunity" Oldstone M.B.A., ed. Current Topics  
in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin,  
Springer-Verlag, 1989
- (15) Rudge P., Journal of Neurology, Neurosurgery and  
Psychiatry 1991; 54, 853-855
- 30 (16) Gessain A. et coll., J. Infect. Disease 1988; 1226-  
1234
- (17) Koprowski H. et coll., Nature 1985; 318, 154
- (18) Ohta M. et coll., J. Immunol. 1986; 137, 3440
- (19) Reddy E.P. et coll., Science 1989; 243, 529
- 35 (20) Greenberg S.J. et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
1989; 86, 2878

- (21) Richardson J.H. et coll., Science 1989; 246, 821
- (22) Hauser S.L. et coll., Nature 1986; 322, 176
- (23) Karpas A. et coll., Nature 1986; 322, 177
- (24) Perron H. et coll., Res. Virol. 1989, 140, 551-561
- 5 (25) Perron H. et coll., "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, 111-116
- (26) Perron H. et coll., The Lancet 1991, 337, 862-863
- (27) Perron H. et coll., J. Gen. Virol. 1993, 74, 65-72
- 10 (28) Fields et Knipe, Fundamental Virology 1986, Rev Press N.Y.
- (29) Nielsen P.E. et coll, Science 1991; 254, 1497-1500
- (30) Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982
- 15 (31) Southern. E.M., J. Mol. Biol. 1975, 98, 503
- (32) Dunn A.R. et Hassel J.A., Cell 1977, 12, 23
- (33) Shih et coll., J. Virol. 1989, 63, 64-75
- (34) Perron H. et coll., Res. Vir. 1992, 143, 337-350
- (35) Chomzynski P. et N. Sacchi, Analytical Biochemistry
- 20 1987, 162, 156-159
- (36) Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- (37) Meyerhans et coll., Cell 1989, 58, 901-910
- 25 (38) Linial M.L. and Miller A.D., "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K., éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990
- (39) Lori F. et coll., J. Virol. 1992, 66, 5067-5074
- 30 (40) La Mantia et coll., Nucleic Acids Research 1991, 19, 1513-1520
- (41) Frohman et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 8998-9002
- (42) F. Mallet et coll., Journal of Clinical Microbiology
- 35 1993; 31, 1444-1449

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: BIOMERIEUX
- (B) RUE: AUCUNE
- (C) VILLE: MARCY L'ETOILE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 69280

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEP EXTENSION

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 38

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1158 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

CCCTTTGCCA CTACATCAAT TTAGGAGTA AGGAAACCCA ACGGACAGTG GAGGTTAGTG 60
CAAGAACTCA GGATTATCAA TGAGGCTGTT GTTCCTCTAT ACCCAGCTGT ACCTAACCCCT 120
TATACAGTGC TTTCCCAAAT ACCAGAGGAA GCAGAGTGGT TTACAGTCCT GGACCTTAAG 180
GATGCCTTTT TCTGCTATCC TGTACGTCCT GACTCTCAAT TCTTGTTTGC CTTTGAAGAT 240
CCTTTGAACC CAACGTCTCA ACTCACCTGG ACTGTTTAC CCCAAGGGTT CAGGGATAGC 300
CCCCATCTAT TTGGCCAGGC ATTAGCCCAA GACTTGAGTC AATTCTCATA CCTGGACACT 360
CTTGTCCTTC AGTACATGGA TGATTACTT TTAGTGGCCC GTTCAGAAAC CTTGTGCCAT 420
CAAGCCACCC AAGAACTCTT AACTTTCCTC ACTACCTGTG GCTACAAGGT TTCCAAACCA 480
AAGGCTCGGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTNAGGGC TAAATATTATC CAAAGGCACC 540
AGGGCCCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCCT ATACTGGCTT ATCCTCATCC CAAAACCTA 600
AAGCAACTAA GAGGGTTTCT TGGCATAACA GGTTCCTGCC GAAAACAGAT TCCCAGGTAC 660
ASCCCAATAG CCAGACCATT ATATACACTA ATTANGGAAA CTCAGAAAGC CAATACCTAT 720
TTAGTAAGAT GGACACCTAC AGAAGTGGCT TTCCAGGCCC TAAAGAAGGC CCTAACCCAA 780
GCCCCAGTGT TCAGCTTGCC AACAGGGCAA GATTTTCTT TATATGCCAC AGAAAAACA 840
GGAATAGCTC TAGGAGTCCT TACGCAGGTC TCAGGGATGA GCTTGCAACC CGTGGTATAC 900
CTGAGTAAGG AAATTGATGT AGTGCCAAAG GGTGGCCTC ATNGTTTATG GGTAATGGNG 960
GCAGTAGCAG TCTNAGTATC TGAAGCAGTT AAAATAATAC AGGGAAGAGA TCTTNCTGTG 1020
TGGACATCTC ATGATGTGAA CGGCATACTC ACTGCTAAAG GAGACTTGTG GTTGTGAGAC 1080
AACCATTTAC TTAANTATCA GGCTCTATTA CTTGAAGAGC CAGTGCTGNG ACTGCGCACT 1140
TGTGCAACTC TTAACCC 1158

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 297 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

58

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

CCCTTTGCCA CTACATCAAT TTTAGGAGTA AGGAAACCCA ACGGACAGTG GAGGTTAGTG 60
CAAGAACTCA GGATTATCAA TGAGGCTGTT GTTCCTCTAT ACCCAGCTGT ACCTAACCT 120
TATACAGTGC TTTCCCAAAT ACCAGAGGAA GCAGAGTGGT TTACAGTCCT GGACCTTAAG 180
GATGCCTTTT TCTGCATCCC TGTACGTCCT GACTCTCAAT TCTTGTTCG CTTTGAAGAT 240
CCTTTGAACC CAACGTCTCA ACTCACCTGG ACTGTTTAC CCCAAGGGT CAAGGGA 297

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

```

GTTTAGGGAT ANCCCTCATC TCTTTGGTCA GGTACTGGCC CAAGATCTAG GCCACTTCTC 60
AGGTCCAGSN ACTCTGTYCC TTCAG 85

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 86 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

GTTCAGGGAT AGCCCCCATC TATTTGGCCA GGCCTAGCT CAATACTTGA GCCAGTTCTC 60
ATACCTGGAC AYTCTYGTCC TTCGGT 86

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

```

GTTCARRGA TAGCCCCCATC TATTGGCCW RGYATTAGCC CAAGACTTGA GYCAATTCTC 60
ATACCTGGA CACTCTTGTC TTYRG 85

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:



59

GTTCAGGGAT AGCTCCCATC TATTGGCCT GGCATTAACC CGAGACTTAA GCCAGTTCTY 60  
 ATACGTGGAC ACTCTGTCC TTTGG 85

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 111 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GTGTTGCCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCTMTTGT GYCWRGYAYT RRCYCRAKAY 60  
 YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCTB KYCCTTYRGT ACATGGATGA C 111

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 645 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

TCAGGGATAG CCCCCATCTA TTTGGCCAGG CATTAGCCCA AGACTTGAGT CAATTCTCAT 60  
 ACCTGGACAC TCTTGTCCTT CAGTACATGG ATGATTTACT TTTAGTCGCC CGTTCAGAAA 120  
 CCTTGTGCCA TCAAGCCACC CAAGAACTCT TAACTTTCTT CACTACCTGT GGCTACAAGG 180  
 TTTCCAAACC AAAGGCTCGG CTCTGCTCAC AGGAGATTAG ATACTNAGGG CTAAAATTAT 240  
 CCAAAGGCAC CAGGGCCCTC AGTGAGGAAC GTATCCAGCC TATACTGGCT TATCCTCATC 300  
 CCAAACCCCT AAAGCAACTA AGAGGGTTCC TTGGCATAAC AGGTTTCTGC CGAAAACAGA 360  
 TTCCCAGGTA CASCCCAATA GCCAGACCAT TATATACACT AATTANGGAA ACTCAGAAAG 420  
 CCAATACCTA TTTAGTAAGA TGGACACCTA CAGAAGTGGC TTTCCAGGCC CTAAAGAAGG 480  
 CCCTAACCCA AGCCCCAGTG TTCAGCTTGC CAACAGGGCA AGATTTTCTT TTATATGCCA 540  
 CAGAAAAAAC AGGAATAGCT CTAGGAGTCC TTACGCAGGT CTCAGGGATG AGCTTGCAAC 600  
 CCGTGGTATA CCTGAGTAAG GAAATTGATG TAGTGGCAAA GGGTT 645

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 741 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CAAGCCACCC AAGAACTCTT AAATTTCTC ACTACCTGTG GCTACAAGGT TTCCAAACCA 60  
 AAGGCTCAGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTTAGGGT TAAAATTATC CAAAGGCACC 120  
 AGGGGCCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCCT ATACTGGGTT ATCCTCATCC CAAAACCTA 180  
 AAGCACTAA GAGGGTTCTT TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCCCAGGT 240  
 ACACCAAAA TAGCCAGACC ATTATATACA CTAATTAAGG AACTCAGAA AGCCAATACC 300  
 TATTTAGTAA GATGGACACC TAAACAGAAG GCTTTCCAGG CCCTAAAGAA GGCCCTAAC 360  
 CAAGCCCCAG TGTTCAGCTT GCCAACAGGG CAAGATTTT CTTTATATGG CACAGAAAA 420  
 ACAGGAATCG CTCTAGGAGT CCTTACACAG GTCCGAGGGA TGAGCTTGCA ACCCGTGGCA 480  
 TACCTGAATA AGGAAATTGA TGTAGTGGCA AAGGTTGGC CTCATNGTTT ATGGGTAATG 540

60

GNGGCAGTAG CAGTCTNAGT ATCTGAAGCA GTTAAAATAA TACAGGGAAG AGATCTTNCT 600  
 GTGTGGACAT CTCATGATGT GAACGGCATA CTCACTGCTA AAGGAGACTT GTGGTTGTCA 660  
 GACAACCAT TACTTAANTA TCAGGCTCTA TTAAGTGAAG AGCCAGTGCT GNGACTGCGC 720  
 ACTTGTGCAA CTCTTAACC C 741

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TGGAAAGTGT TGCCACAGGG CGCTGAAGCC TATCGCGTGC AGTTGCCGGA TGCCGCCTAT 60  
 AGCCTCTACA TGGATGACAT CCTGCTGGCC TCC 93

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 96 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GCCTATCGCG TGCAGTTGCC GGATGCCGCC 60  
 TATAGCCTCT ACGTGGATGA CTSCTGAAG CTTGAG 96

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 748 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TGCAAGCTTC ACCGCTTGCT GGATGTAGGC CTCAGTACCG GNGTGCCCCG CGCGCTGTAG 60  
 TTCGATGTAG AAAGCGCCCG GAAACACGCG GGACCAATGC GTCGCCAGCT TGCGGCCAG 120  
 CGCCTCGTTG CCATTGGCCA GCGCCACGCC GATATCACCC GCCATGGCGC CGGAGAGCGC 180  
 CAGCAGACCG GCGGCCAGCG GCGCATTCTC AACGCCGGGC TCGTCAACC ATTCGGGGGC 240  
 GATTCCGCA CGACCGCGAT GCTGTTGGA GAGCCAGGCC CTGCCAGCA ACTGGCACAG 300  
 GTTCAGGTAA CCTGCTTGT CCCGCACCAA CAGCAGCAGG CGGTCGGCT TGTCCGCTC 360  
 GTCGTGATTG GTGATCCACA CGTCAGCCCC GACGATGGGC TTCAGCCCT TGCCACGGC 420  
 TTCCTGTAG ANGCGACCA GCCCGAAGCG ATTGGCGAGA TCGGTCAGCG CCAAGCGCC 480  
 CATGCCATCT TTGGCGGCAG CCTTGACGGC ATCGTCGAGA CGGACATTGC CATCGACGAC 540  
 GGAATATTCG GAGTGGAGAC GGAGGTGGAC GAAGCGCGGC GAATTCATCC GCGTATTGTA 600  
 ACGGGTGACA CCTTCGCAA AGCATTCGCG ACGTCCCGA TTGACCCGGA GCACCCCGC 660  
 ACGGCTGCGC GGGCAGTTAT AATTTCGGCT TACGAATCAA CGGTTACCC CAGGGCGCTG 720  
 AAGCCTATCG CGTGCAATTG CCGGATGC 748

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases

61

- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GCATCCGGCA ACTGCACG 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GTAGTTCGAT GTAGAAAGCG 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GCATCCGGCA ACTGCACG 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

AGGAGTAAG GAAACCCAACG GAC 23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

TAAGAGTTGC ACAAGTGCG 19

62

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TCAGGGATAG CCCCCATCTA T 21

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: paires de bases
  - (B) TYPE: 24 nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AACCCTTTGC CACTACATCA ATTT 24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 15 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUES:
  - (B) EMLACEMENT: 5, 7, 10, 13
  - (D) AUTRES INFORMATIONS: G représente l'inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

GGTCGTGCCG CAGGG 15

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

TTAGGGATA GCCCTCATCTC T 21

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

63

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

TCAGGGATAG CCCCCATCTA T 21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23

AACCCCTTGC CACTACATCA ATTT 24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24

GCGTAAGGAC TCCTAGAGCTA TT 22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25

TCATCCATGT ACCGAAGG 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

64

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26

ATGGGGTTCC CAAGTTCCT 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27

GCCGATATCA CCCGCCATGG 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28

GCATCCGGCA ACTGCACG 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29

CGCGATGCTG GTTGGAGAGC 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30

TCTCCACTCC GAATATTCGG 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases

65

- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31

GATCTAGGCC ACTTCTCAGG TCCAGS 26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUES:

- (B) EMBLACEMENT: 6, 12, 19
- (D) AUTRES INFORMATIONS: G représente l'inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32

CATCTGTTTG GGCAGGCAGT AGC 23

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33

CTTGAGCCAG TTCTCATACC TGGA 24

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34

AGTGYTRCCM CARGGCGCTG AA 22

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

66

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35

GMGGCCAGCA GSAKGTCA TC CA 22

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36

GGATGCCGCCT ATAGCCTCTAC 20

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37

AAGCCTATCG CGTGCA GTTG CC 22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

TAAAGATCTA GAATTCGGCT ATAGCGGCA TCCGGCAAGT 40



## REVENDECATIONS

1/ Composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent qui  
5 consiste en un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant  
10 issus d'une même souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes.

15 2/ Composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, associés à la sclérose en plaques, à savoir, un premier agent consistant en un virus humain possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux  
20 endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant produits par une même lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de  
25 l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire au moins l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants.

30 3/ Composition comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir un premier agent consistant en un virus, ou un variant dudit virus, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,  
35 SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires,

et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et un second agent pathogène et/ou infectant, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et préférentiellement au moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

4/ Procédé de détection d'un premier agent pathogène et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre au moins un fragment nucléique, à savoir un premier fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et/ou un second fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs

séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et de préférence au moins 90 % d'homologie avec  
5 une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires, chacun desdits fragments étant notamment une sonde.

5/ Composition diagnostique, prophylactique ou  
10 thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment nucléique, à savoir un premier fragment nucléique dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05,  
15 SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec  
20 une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et/ou un second fragment nucléique dont la séquence nucléotidique comprend une  
25 séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et de préférence au  
30 moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

6/ Procédé pour détecter et/ou identifier une association d'agents pathologiques et/ou infectants,  
35 associés à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN

et/ou un ADN présumé appartenir à au moins un dit agent pathologique et/ou infectant, et/ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, avec une composition comprenant un premier fragment nucléotidique et un second fragment

5 nucléotidique, la séquence nucléotidique dudit premier fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs

10 séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,

15 SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires, et la séquence nucléotidique dudit second fragment comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs

20 séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70 % et de préférence au moins 90 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010,

25 SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

7/ Procédé de détection dans un échantillon biologique d'un premier agent pathologique et/ou infectant, et/ou d'un second agent pathologique et/ou

30 infectant, associés à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre une composition comprenant un premier polypeptide codé de manière partielle ou totale par le premier fragment nucléotidique défini à la revendication 4, et/ou un second polypeptide codé de

35 manière partielle ou totale par le deuxième fragment nucléotidique défini à la revendication 4.

8/ Composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le premier polypeptide et/ou le second polypeptide, définis à la revendication 7.

- 5           9/ Composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un premier ligand, notamment anticorps, spécifique du premier polypeptide, et/ou un second ligand, notamment anticorps, spécifique du second polypeptide, lesdits premier et  
10 second polypeptides étant définis à la revendication 7.

- 10/ Lignée cellulaire, dénommée PLI-2, telle que déposée le 22.07.1992, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201, ou toute lignée cellulaire dérivée, ou toute progéniture de cette lignée, pour autant que ces  
15 lignées et progénitures soient capables de produire un anticorps obtenu à partir de la dite lignée PLI-2, ou tout autre anticorps présentant une réaction immunologique croisée avec ledit anticorps.

- 11/ Souche virale, dénommée POL-2 telle que  
20 déposée le 22.07.1992, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, ou toute souche dérivée, ou toute progéniture de cette souche, pour autant que ces souches et progénitures soient capables de produire un antigène obtenu à partir de la dite souche POL-2, ou tout autre  
25 antigène présentant une réaction immunologique croisée avec ledit antigène.

- 12/ Lignée cellulaire, dénommée LM7PC, telle que déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, ou toute lignée cellulaire dérivée, ou  
30 toute progéniture de cette lignée, pour autant que ces lignées et progénitures soient capables de produire un anticorps obtenu à partir de la dite lignée LM7PC, ou tout autre anticorps présentant une réaction immunologique croisée avec ledit anticorps.

- 35           13/ Souche virale, dénommée MS7PG, telle que déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro

d'accès V93010816, ou toute souche dérivée, ou toute progéniture de cette souche, pour autant que ces souches et progénitures soient capables de produire un antigène obtenu à partir de la dite souche MS7PG, ou tout autre  
5 antigène présentant une réaction immunologique croisée avec ledit antigène.

14/ Matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à  
10 la sclérose en plaques, issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi l'une quelconque des souches des revendications 11 et 13, et les souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un  
15 anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées.

15/ Matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase inverse, associé à  
20 une famille d'éléments rétroviraux endogènes, associé à la sclérose en plaques, produit par l'une quelconque des lignées cellulaires des revendications 10 et 12, ou par toute culture cellulaire infectée susceptible de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu  
25 par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées.

16/ Matériel viral caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi  
30 SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100  
35 monomères contigus, au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique

choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,  
SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,  
SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences  
complémentaires.

- 5 17/ Matériel rétroviral, associé à la sclérose en  
plaques, caractérisé en ce que le gène pol de son génome  
comprend une séquence nucléotidique équivalente avec, et  
notamment présentant au moins 50 % d'homologie, de  
préférence au moins 65% d'homologie avec une séquence  
10 nucléotidique appartenant au gène pol du génome du  
rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9.

- 18/ Matériel rétroviral associé à la sclérose en  
plaques, caractérisé en ce que le gène pol de son génome  
code pour une séquence peptidique présentant au moins  
15 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une  
séquence peptidique codée par le gène pol du génome du  
rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9.

- 19/ Matériel rétroviral associé à la sclérose en  
plaques, caractérisé en ce que le gène pol de son génome  
20 code pour une séquence peptidique présentant, pour toute  
suite contigue d'au moins 30 acides aminés, au moins 50 %  
et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une  
séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique  
choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,  
25 SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,  
SEQ ID N08, SEQ ID N09, et leurs séquences  
complémentaires.

- 20/ Fragment nucléotidique, dont la séquence  
nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie  
30 parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,  
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,  
SEQ ID N09, leurs séquences complémentaires, et leurs  
séquences équivalentes, notamment les séquences  
nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100  
35 monomères contigus, au moins 50%, et de préférence au  
moins 70% d'homologie, avec une séquence choisie parmi

SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,  
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,  
SEQ ID N09, et leurs séquences complémentaires.

21/ Amorce spécifique pour l'amplification par  
5 polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un matériel viral  
selon l'une quelconque des revendications 14 à 19,  
caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence  
nucléotidique identique ou équivalente à au moins une  
partie de la séquence nucléotidique d'un fragment selon la  
10 revendication 20, notamment une séquence nucléotidique  
présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au  
moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit  
fragment.

22/ Amorce selon la revendication 21,  
15 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence  
nucléotidique choisie parmi SEQ ID N016, SEQ ID N017,  
SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021,  
SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025,  
SEQ ID N026, SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, et  
20 leurs séquences complémentaires.

23/ Sonde susceptible de s'hybrider  
spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un matériel viral  
selon l'une quelconque des revendications 14 à 19,  
caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence  
25 nucléotidique identique ou équivalente à au moins une  
partie de la séquence nucléotidique d'un fragment selon la  
revendication 20, notamment une séquence nucléotidique  
présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au  
moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit  
30 fragment.

24/ Sonde selon la revendication 23, caractérisée  
en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie  
parmi SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06,  
SEQ ID N07, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018,  
35 SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022,  
SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026,



SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, et leurs séquences complémentaires.

25/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 23 ou 24, ou d'une amorce selon la revendication 21 ou 22, pour détecter, séparer, ou identifier, dans un échantillon biologique, un matériel viral selon l'une quelconque des revendications 14 à 19.

26/ Procédé pour détecter, séparer, ou identifier, dans un échantillon biologique, le matériel viral selon l'une des revendications 14 à 19, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au moins une sonde selon la revendication 24.

27/ Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que, avant de mettre en contact l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, avec la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce d'amplification selon la revendication 22, et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

28/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un matériel viral, associé à la sclérose en plaques, selon l'une des revendications 14 à 19, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au moins une sonde selon la revendication 24, éventuellement on amplifie et on détecte ledit ARN et/ou ADN.

29/ Agent pathogène et/ou infectant, à l'état purifié ou isolé, différent du matériel viral selon l'une des revendications 14 à 19, associé à la sclérose en plaques, issu d'une souche virale choisie parmi l'une quelconque des souches des revendications 11 et 13, et les souches variantes consistant en des agents pathogènes et/ou infectants comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins

un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, respectivement différents de l'un ou l'autre matériel viral desdites souches.

- 5           30/ Agent pathogène et/ou infectant, à l' état purifié ou isolé, différent du matériel viral selon l'une des revendications 14 à 19, associé à la sclérose en plaques, produit par l'une quelconque des lignées cellulaires des revendications 10 et 12, et par toute  
10 culture cellulaire infectée susceptible de produire un agent pathogène et/ou infectant comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants produits  
15 par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées, respectivement différents de l'un ou l'autre matériel viral desdites souches.

- 31/ Agent pathogène et/ou infectant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une  
20 séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques, présentant au moins 70 % et préférentiellement au moins 90 % d'homologie avec une  
25 séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012 et leurs séquences complémentaires.

- 32/ Fragment nucléotidique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique choisie parmi  
30 SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70%, et de préférence au moins 90% d'homologie, avec une séquence  
35 choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, et leurs séquences complémentaires.

33/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un agent pathogène et/ou infectant selon l'une quelconque des revendications 29 à 31, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence  
5 nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment selon la revendication 32, notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit  
10 fragment.

34/ Amorce selon la revendication 33, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029,  
15 SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, et leurs séquences complémentaires.

35/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un agent pathogène et/ou infectant selon l'une quelconque des revendications  
20 29 à 31, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment selon la revendication 32, notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au  
25 moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.

36/ Sonde selon la revendication 35, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029,  
30 SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, et leurs séquences complémentaires.

37/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 35 ou 36, et/ou d'une amorce selon la revendication 33 ou 34, pour détecter et/ou identifier,  
35 dans un échantillon biologique, un agent pathologique

et/ou infectant selon l'une quelconque des revendications 29 à 31.

38/ Procédé pour détecter, séparer ou identifier, dans un échantillon biologique, l'agent pathogène et/ou infectant selon l'une quelconque des revendications 29 à 31, caractérisé en ce qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir audit agent, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au moins une sonde selon la revendication 36.

10 39/ Procédé selon la revendication 38 caractérisé en ce que, avant de mettre en contact l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, avec la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce d'amplification selon la revendication 34, et on amplifie 15 ledit ARN et/ou ADN.

40/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un agent infectant et/ou pathogène associé à la sclérose en plaques, selon l'une quelconque des revendications 29 à 31, caractérisé en ce 20 qu'on met en contact un ARN et/ou un ADN spécifique audit agent et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, avec au moins une sonde selon la revendication 36, et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

41/ Composition diagnostique, prophylactique ou 25 thérapeutique, notamment pour inhiber l'expression d'au moins un agent pathogène et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde selon la revendication 23 ou 24, ou une sonde selon la revendication 35 ou 36, et/ou au moins une 30 amorce selon la revendication 21 ou 22 ou une amorce selon la revendication 33 ou 34.

42/ ARN ou ADN, et notamment vecteur de répllication, comprenant un fragment selon la revendication 20 et/ou un fragment selon la revendication 32.

35 43/ Polypeptide, ayant au moins 5, et de préférence 10 acides aminés, codé par toute séquence

nucléotidique du génome d'un agent pathogène et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon la revendication 20 ou d'un fragment 5 nucléotidique selon la revendication 32.

44/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon la revendication 43.

10 45/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand, notamment anticorps, spécifique d'au moins un polypeptide selon la revendication 43.

1 / 18

## FIG 1

```
pol SHIH  TGGAAAGTGT TGGCACAGG CGCTGAAGC TATCGCGTGC AGTTGCGGGA 50
pol SHIH  TGGCGCTAT AGCTCTACA TGGATGACAT CCTGCTGGCC TCC 93
```

SEQ ID NO 10

2 / 18

## FIG 2

Consensus GTTTAGGGAT ANOCTCATC TCTTTGGTCA GGTACTGGCC CAAGATCTAG 50  
Consensus GCGACTTCTC AGGTCCAGSN ACTCTGTGCC TTCAG 85

## SEQ ID NO3

Consensus GTTCAGGGAT AGCCCCATC TATTTGGCCA GGCCTAGCT CAATACTTGA 50  
Consensus GCGAGTCTC ATAAGTGGAC ATCTGTGTCC TTGGT 85

## SEQ ID NO4

Consensus GTTCARRGAT AGCCCCATC TATTTGGCCW RGYATTAGCC CAAGACTTGA 50  
Consensus GYCAATCTC ATAAGTGGAC ACTCTGTGCC TTYRG 85

## SEQ ID NO5

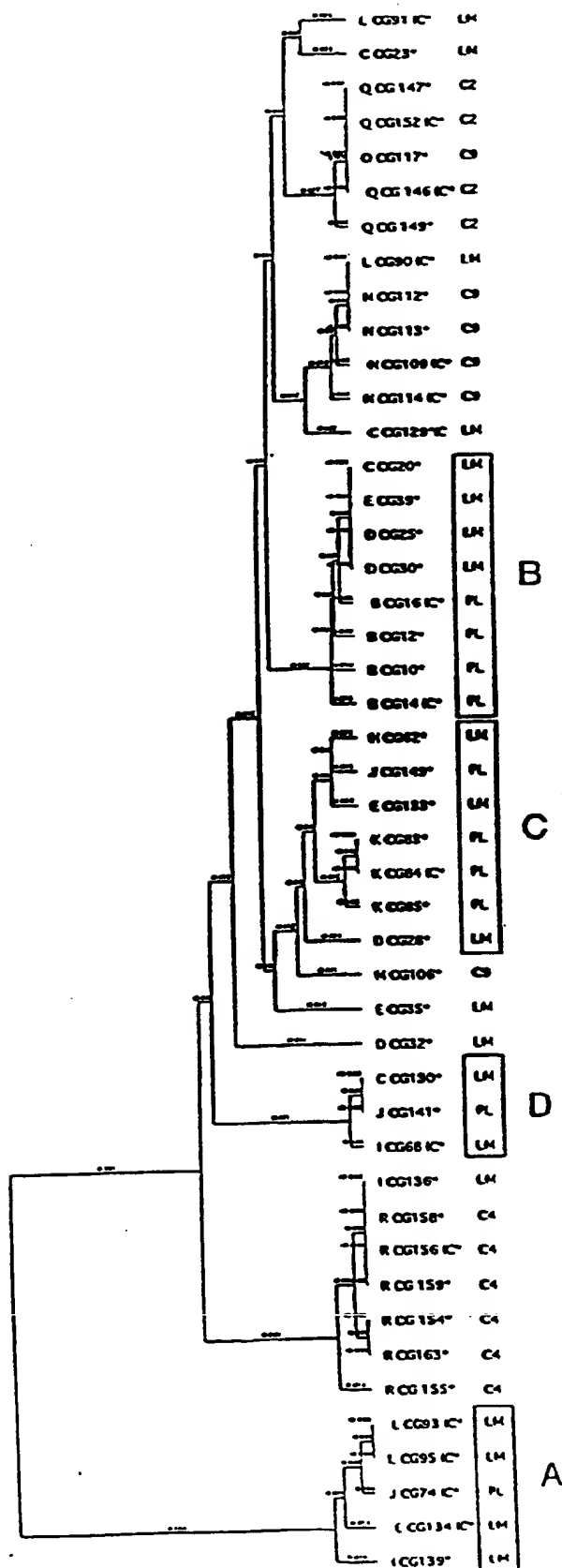
Consensus GTTCAGGGAT AGCTCCCATC TATTTGGCCT GGCATTAAAC CGAGACTTAA 50  
Consensus GCGAGTCTC ATAAGTGGAC ACTCTGTGCC TTGG 85

## SEQ ID NO6

Consensus GTGTGGCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCTMTTIG GYCWRYAYT  
Consensus RRCYCRAKAY YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAVCTCB KYOCTTYRGT  
Consensus ACATGGATGA C

## SEQ ID NO7

FIG 3





4 / 18

## FIG 4

## CONSENSUS A

GTTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTGGTCA GGTACTGGCCCAAGA TCTAGGCCACTTCTC 60  
 V . G . P S S L W S G T G P R S R P L L  
 F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S  
 L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q

AGGTCCAGGCACTCT GTTCCTTCAG 85  
 R S R H S V P S  
 G P G T L F L Q  
 V Q A L C S F

## CONSENSUS B

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCCTAGCTCAATA CTTGAGCCAGTTCTC 60  
 V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L  
 F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S  
 S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H

ATACCTGGACACTCT TGTCTTCGGT 86  
 I P G H S C P S  
 Y L D T L V L R  
 T W T L L S F G

## CONSENSUS C

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCATTAGCCCAAGA CTTGAGTCAATTCTC 60  
 V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L  
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S  
 S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H

ATACCTGGACACTCT TGTCTTCAG 85  
 I P G H S C P S  
 Y L D T L V L Q  
 T W T L L S F

## CONSENSUS D

GTTCAGGGATAGCTC CCATCTATTTGGCCT GGCATTAACCCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC 60  
 V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L  
 F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S  
 S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H

ATACGTGGACACTCT TGTCTTTGG 85  
 I R G H S C P L  
 Y V D T L V L W  
 T W T L L S F

5 / 18

## FIG 5

Consensus	TGGATCCAG TGYTCCCACA GGGGCGCTGAA GCGTATCGCG TGCAGTTGCC	50
Consensus	GGATGCGCGC TATAGCGCTCT ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAG	96

SEQ ID NO 11

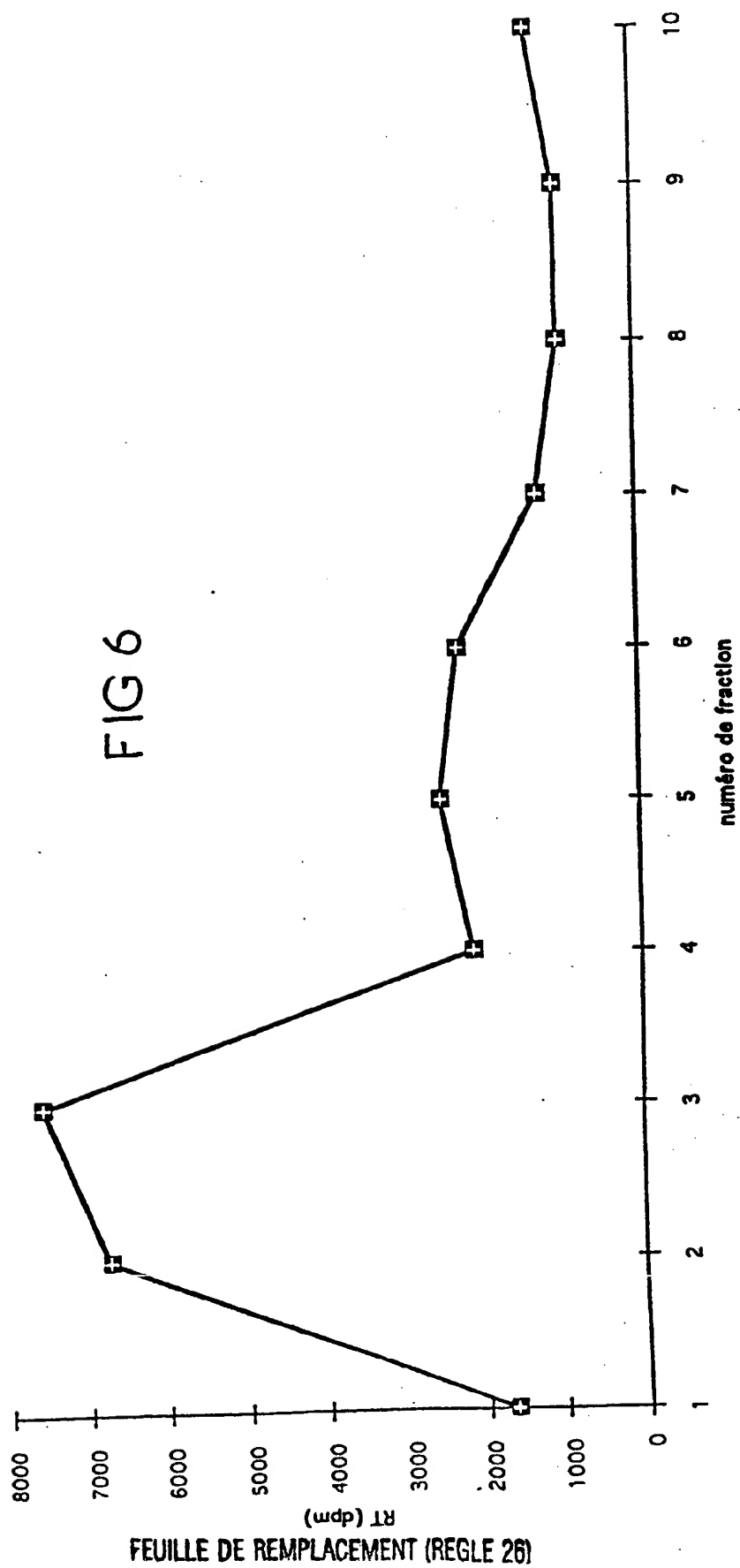
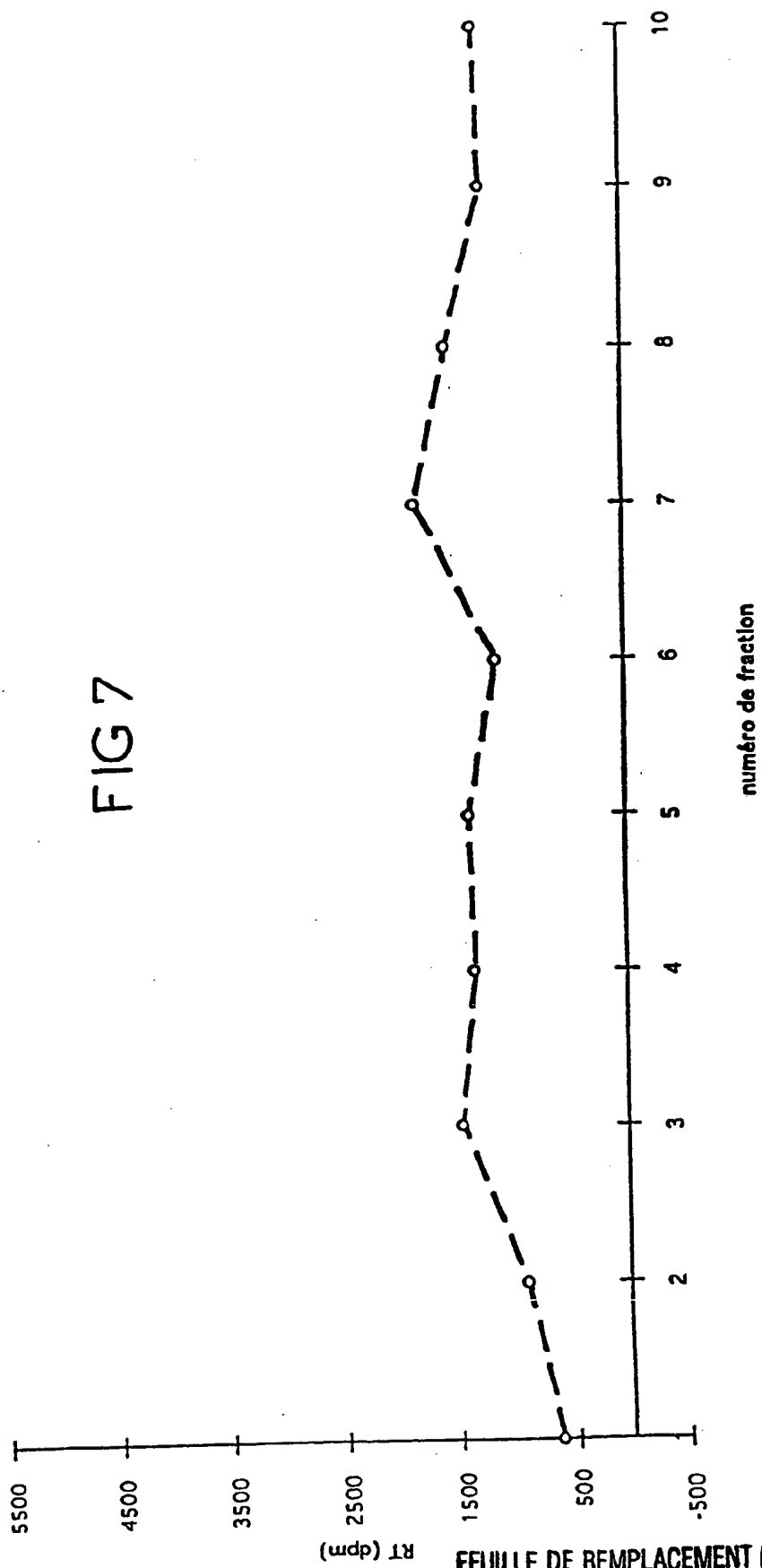


FIG 7



## FIG 8

CAAGCCACCC AAGAACICTT AAATTTCTCT ACTACCTGTG GCTACAAGGT	50
TTCCAAACCA AAGGCTCAGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTTAGGGT	100
TAAATTTATC CAAAGGCAOC AGGGGCTCA GTGAGGAACG TATOCAGCT	150
ATACTGGGTT ATCTCATCC CAAAACCTA AAGCAACTAA GAGGTTCT	200
TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCCAGGT ACAACCAAA	250
TAGCCAGAC ATTATATACA CTATTAAGG AAATCAGAA AGCAATAC	300
TATTIAGTAA GATGGACAC TAACAGAGG GCTTTCAGG CCTTAAGAA	350
GGCCCTAAC CAAGCCCCAG TGTTCAGCTT GCAACAGGG CAAGTTTTT	400
CTTTATATGG CACAGAAAA ACAGGAATCG CTCIAGGAGT OCTTACACG	450
GTCGAGGGA TGAGCTTGC ACCGTGGCA TACCTGAATA AGGAAATGA	500
TGTAGTGGCA AAGGTTGGC CTCATNGTTT ATGGGTAATG GNGGCAGTAC	550
CAGTCINAGT ATCTGAAGCA GTTAAAATA TACAGGGAAG AGATCTTCT	600
GGTGGACAT CTCATGATG GAAAGGCATA CTCCTGCTA AAGGAGACTT	650
GTTGTGTCA GCAACCATT TACTTAANIA TCAGGCTCTA TACTTGAAG	700
AGCCAGTCT GNGACTGGC ACTTGTGCAA CTCCTAAC C	741

SEQ ID NO9

## FIG 9

TCAGGGATAGCCCCCATCTATTTGGCCAGGCATTAGCCCAAGACTTGAGTC  
AATTCTCATACCTGGACACTCTTGTCCCTTCAGTACATGGATGATTTACTTT  
TAGTCGCCCGTT CAGAAACCTTGTGCCATCAAGCCACCCAAGAACTCTTAA  
CTTTCCTCACTACCTGTGGCTACAAGGTTTCCAAACCAAAGGCTCGGCTCT  
GCTCACAGGAGATTAGATACTNAGGGCTAAAATTATCCAAAGGCACCAGG  
GOCCTCAGTGAGGAACGTATCCAGCCTATACTGGCTTATCCTCATCCCAA  
ACCCTAAAGCAACTAAGAGGGTTCCCTGGCATAACAGGTTTCTGOCGAAA  
ACAGATTCCCAGGTACASCOCAATAGCCAGACCATTATATACACTAATTA  
NGGAAACTCAGAAAGCCAATACCTATTTAGTAAGATGGACACCTACAGAA  
GTGGCTTTCAGGGCCCTAAAGAAGGCCCTAACCCAAGCCCCAGTGTT CAGC  
TTGCCAACAGGGCAAGATTTTTCTTTATATGCCACAGAAAAAACAGGAAT  
AGCTCTAGGAGTCCTTACGCAGGTCTCAGGGATGAGCTTGCAACCCGTGGT  
ATACCTGAGTAAGGAAATTGATGTAGTGGCAAAGGGTT

SEQ ID NO 8



11/18

10 20 30 40 50 60 70  
OCC TTT GGC ACT ACA TCA ATT TTA GGA GTA AGG AAA CCC AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTG CAA GAA CTC AGG  
F F A T T S I L G V R K P N G Q W R L V O E L R  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

80 90 100 110 120 130 140  
ATT ATC AAT GAG GCT GTT GTT OCT CTA TAC CCA GCT GTA OCT AAC OCT TAT ACA GTG CTT TCC CAA ATA CCA  
I I N E A V V P L Y F A V P N P Y T V L S Q I P  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

150 160 170 180 190 200 210  
GAG GAA GCA GAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CTT AAG GAT GGC TTT TTC TCC ATC OCT GTA GGT OCT GAC TCT  
E E A E W F T V L D L K D A F F C I P V R P D S  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

220 230 240 250 260 270 280  
CAA TTC TTG TTT GGC TTT CAA GAT OCT TTG AAC CCA AGG TCT CAA CTC ACC TGG ACT GTT TTA CCC CAA GGC  
Q F L F A F E D F L N P T S Q L T W T V L F Q G  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

290 300 310 320 330 340 350 360  
TTC AGG GAT AGC CCC CAT CTA TTT GGC CAG GCA TTA GGC CAA GAC TTG ACT CAA TTC TCA TAC CTG GAC ACT  
F R D E F H L F G A L A Q D L S Q F S Y L D T  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

370 380 390 400 410 420 430  
CTT GTC CTT CAG TAC ATG GAT GAT TTA CTT TTA GTC GGC OCT TCA GAA ACC TTG TCC CAT CAA GGC ACC CAA  
L V L Q Y H D D L L L V A R S E T L C H G A T Q  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

440 450 460 470 480 490 500  
CAA CTC TTA ACT TTC CTC ACT ACC GGT GGC TAC AAG GTT TCC AAA CCA AAG GCT GGC CTC TCC TCA CAG GAG  
E L L T F L T T C G Y K V S K F K A R L C S Q D  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

510 520 530 540 550 560 570  
ATT ACA TAC TGA GCG CTA AAA TTA TCC AAA GGC ACT AAG GGC CTC AGT GAG GAA GGT ATC CAG OCT ATA CAG  
I R Y X G L K L S K C T R A L S E E R I Q P I L  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

580 590 600 610 620 630 640  
GCT TAT OCT GAT GGC AAA ACC CTA AAG CAA CTA ACG GTC CTT GGC ATA ACA GGT TTC TCC CCA AAA CAG  
A Y F H P K T L K Q L R G F L G I T G F C R K Q  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

650 660 670 680 690 700 710 720  
ATT GGC AGG TAC AAG CCA ACG GGC ACG CCA TTA TAT ACA CTA ATT AAG GAA ACT CAG AAA GGC AAT ACC TAT  
I F R Y X P I A R P L Y T L I X E T Q K A H T Y  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

730 740 750 760 770 780 790  
TTA GTA ACA TGG ACA CCT ACA GAA GTG GCT TTC CAG GGC CTA AAG AAG GGC CTA ACC CAA GGC CCA GTG TTC  
L V R W T F T E V A P Q A L K K A L T Q A F V P  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

800 810 820 830 840 850 860  
AOC TTG CCA ACA GCG CAA GAT TTT TCT TTA TAT GGC ACA GAA AAA ACA CCA ATA GCT CTA GGA GTC CTT AGG  
S L P T G Q D F S L Y A T E K T G I A L G V L T  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

870 880 890 900 910 920 930  
CAG GTC TCA GGC ATG AGC TTG CAA GGC GTG GTA TAC CTC AGT AAG GAA ATT GAT GTA GTG CCA AAG GGT TCC  
Q V S G H S L Q P V V Y L S K E I D V V A K G W  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

940 950 960 970 980 990 1000  
CCT CAT NGT TTA TGG GTA ATG GAG CCA GTA GCA GTC TTA GTA TCT GAA GCA GTT AAA ATA ATA CAG CCA AGA  
P H X L W V M X A V A V X V S E A V K I I Q G R  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GAT CTT NCT GTG TGG ACA TCT CTT GAT GTG AAC GGC ATA CTC ACT GCT AAA CCA GAC TTG TGG TTG TCA GAC  
D L K V W T S H D V N G I L T A K G D L M L S D  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150  
AAC CAT TTA CTT AAN TAT CAG GCT CTA TTA CTT GAA CAG CCA GTG CTC NGA CTC GGC ACT TTT CCA ACT CTT  
N H L L X Y Q A L L L E E P V L K L R T C A T L  
TRANSLATION OF MSRV-1 POL - [A]

AAA CCC  
K P

FIG 11 SEQ ID NO 1



12 / 18

10 20 30 40  
\* \* \* \*  
TGCAAGCTTCACCGC TTGCTGGATGTAGGC CTCAGTACCGGNGTG  
50 60 70 80 90  
\* \* \* \*  
CCCCGCGCGCTGTAG TTCGATGTAGAAAGC GCCCGGAAACACGCG  
100 110 120 130  
\* \* \* \*  
GGACCAATGCGTCGC CAGCTTGCGCGCCAG CGCCTCGTTGCCATT  
140 150 160 170 180  
\* \* \* \*  
GGCCAGCGCCACGCC GATATCACCCGOCAT GGCGCCGGAGAGCGC  
190 200 210 220  
\* \* \* \*  
CAGCAGACCGGGGGC CAGCGGGGCATTCTC AACGCCGGGCTCGTC  
230 240 250 260 270  
\* \* \* \*  
GAACCATTOGGGGGC GATTTCGGCAAGACC GCGATGCTGGTTGGA  
280 290 300 310  
\* \* \* \*  
GAGCCAGGCOCTGGC CAGCAACTGGCACAG GTTCAGGTAACCOCTG  
320 330 340 350 360  
\* \* \* \*  
CTTGTCOCCGCAOCAA CAGCAGCAGGGGGT CGGCTTGTCGGGCTC  
370 380 390 400  
\* \* \* \*  
GTGCTGATTGGTGAT CCACAGTTCAGOOCC GAOGATGGGCTTCAC  
410 420 430 440 450  
\* \* \* \*  
GOOCTTGOCACGGC TTCCTTGTAGANGOG CACCAGCCCGAAGGC  
460 470 480 490  
\* \* \* \*  
ATTGGCGAGATCGGT CAGGOCAGGGGGC CATGCCATCTTTGGC  
500 510 520 530 540  
\* \* \* \*  
GGCAGCCTTGACGGC ATCGTCGAGACGGAC ATTGCCATCGACGAC  
550 560 570 580  
\* \* \* \*  
GGAATATTCCGAGTG GAGACGGAGGTGGAC GAAGCGCGGCGAATT  
590 600 610 620 630  
\* \* \* \*  
CATCCGCGTATTGTA ACGGGTGACACCTTC CGCAAAGCATTCCGG  
640 650 660 670  
\* \* \* \*  
ACGTGCCCCGATTGAC CCGGAGCAACCCCGC ACGGCTGCGCGGGCA  
680 690 700 710 720  
\* \* \* \*  
GTTATAATTTCGGCT TACGAATCAACGGGT TACCCACGGGCGCTG  
730 740  
\* \*  
ACCGTATGCGCTG ACCTTCGCGGATTC

FIG 12

SEQ ID NO 12



F1G13

[illegible]



16 / 18

FIG 14

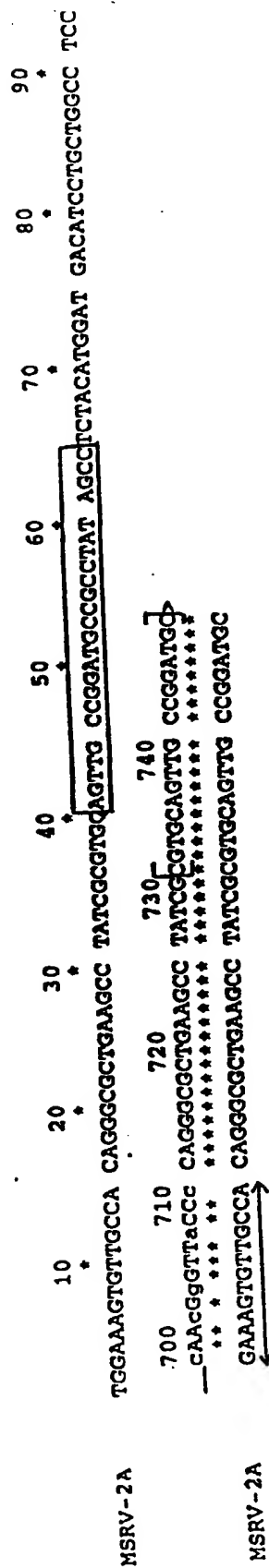


FIG15 1 2 3 4 5 6 7 8 9

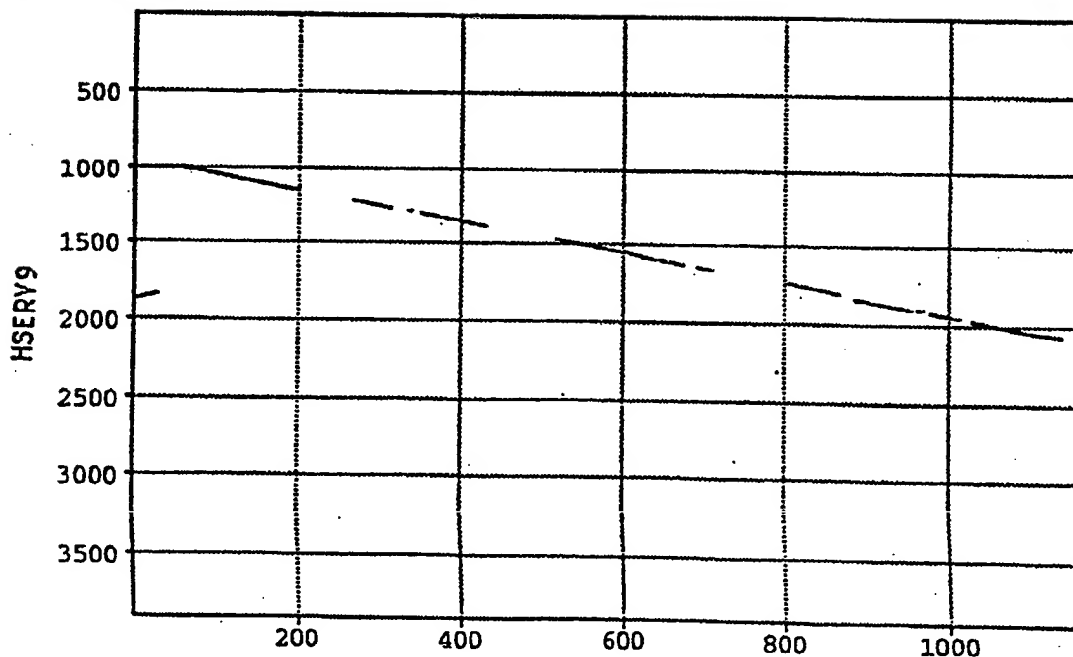
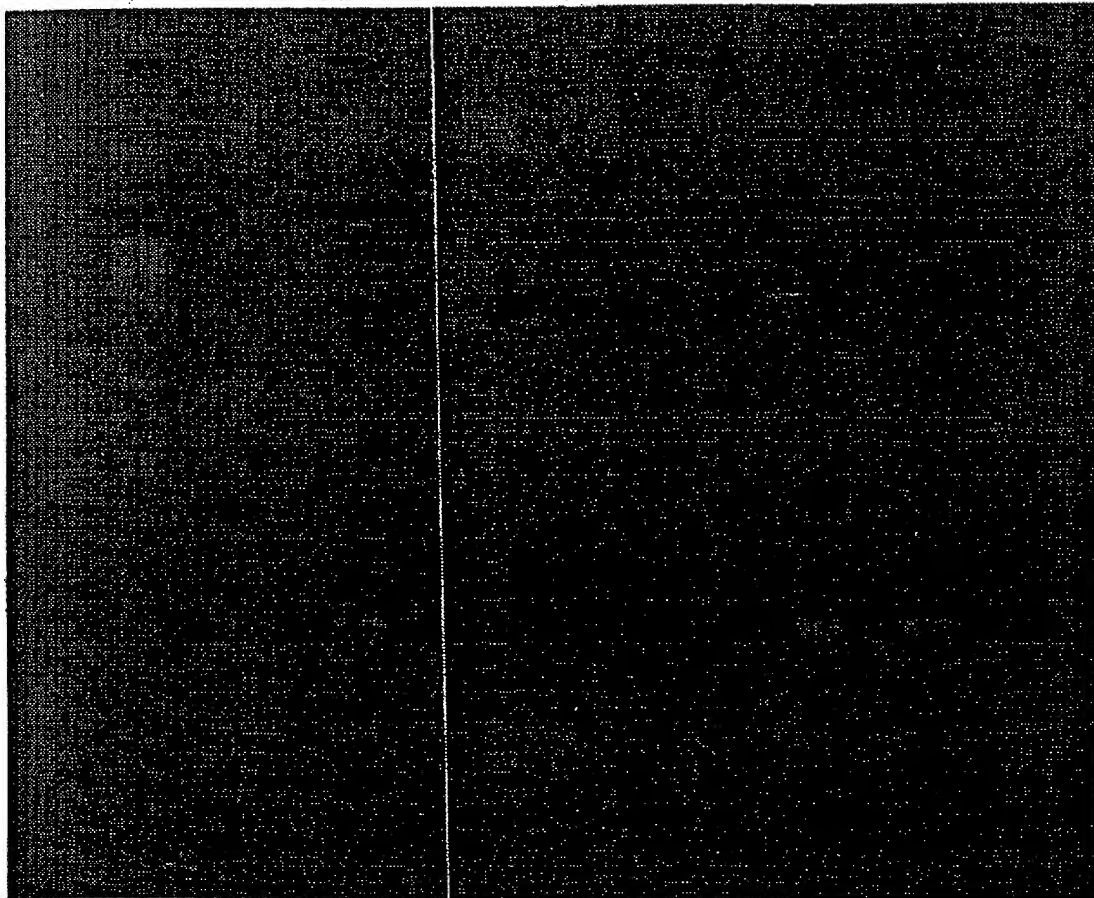


FIG 18

MSRV-1 pol \*

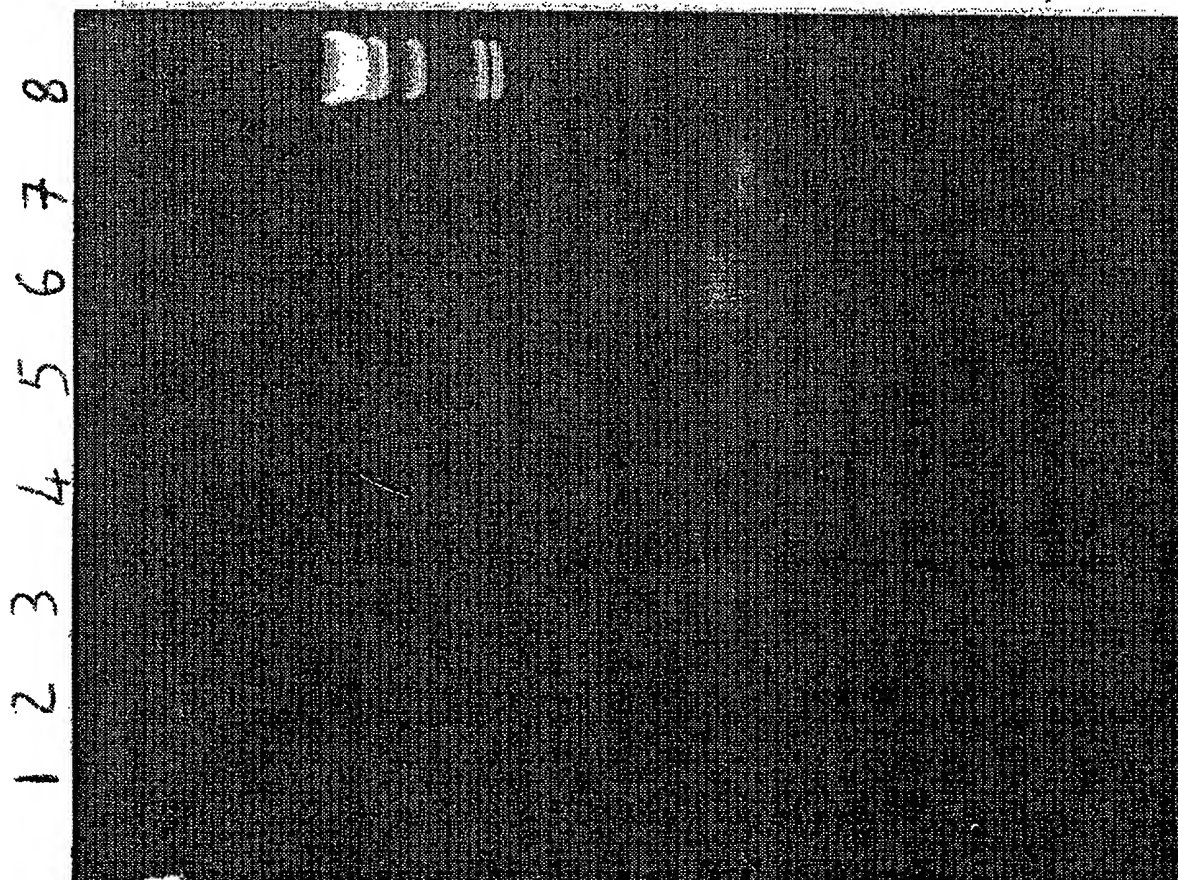
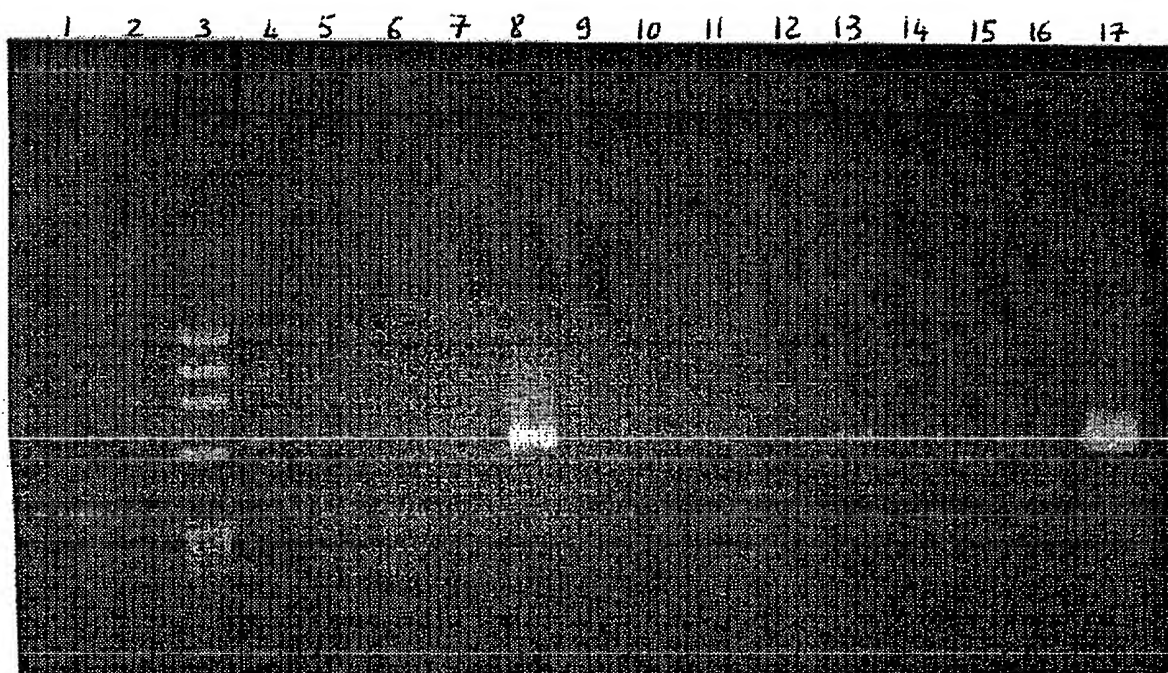


FIG 16

FIG 17



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO  
Biomeries SA  
Chemin de L'orme  
69280 Marcy L'etoile  
France

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  PLI-2	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  92072201
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by:  <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description  <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation  (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 22.07.92 (date of the original deposit) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: Dr Alan Doyle ECACC PHLS CAMR Address: Porton Down	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 9th December, 1992

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO

Biomerieux SA  
Chemin de L'orme  
69280 Marcy L'etoile  
France

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY  
TO WHOM THE VIABILITY STATEMENT  
IS ISSUED

<b>I. DEPOSITOR</b>	<b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>
Name: Biomerieux SA  Address: Chemin de L'orme 69280 Marcy L'etoile France	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: 92072201  Date of the deposit or of the transfer:  22nd July, 1992
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 22nd July, 1992 <sup>1</sup>  <input checked="checked" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable	

- <sup>1</sup> Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- <sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- <sup>3</sup> Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED<sup>4</sup>

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name:

Dr. Alan Doyle, Curator, ECACC

Address:

PHLS Centre for Applied Microbiology & Research  
Porton Down, Salisbury, Wilts. SP4 0JG, U.K.

Signature(s) of person(s) having the power  
to represent the International Depositary  
Authority or of authorized official(s):

Date:

*Alan Doyle*  
9th December, 1992

<sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/95/00142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C12N15/48 C12N5/08 C12N7/00 C12Q1/68 A61K31/70  
 A61K35/76 G01N33/68 C07K14/15 C07K7/06 A61K39/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 20188 (BIO MERIEUX) 14 October 1993	1,2,30
X	cited in the application see the whole document cited in the application	10,11
A	--- AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.5, May 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus isolation from patients with multiple sclerosis: epiphenomenon or causative factor ?' see abstract --- -/--	1-45

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 July 1995

Date of mailing of the international search report

-5. 07. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 95/00142

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LANCET THE, vol.337, no.8745, 6 April 1991, LONDON GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL 'Isolation of retrovirus from patients with Multiple Sclerosis' cited in the application ---</p>	10-15
A	<p>RESEARCH IN VIROLOGY, vol.143, no.5, 1992 pages 337 - 350 H. PERRON ET AL 'In vitro transmission and antigenicity of a Retrovirus isolated from a Multiple Sclerosis patient' see the whole document ---</p>	
A	<p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol.74, 1993 pages 65 - 72 H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex Virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with Multiple Sclerosis' cited in the application ---</p>	
A	<p>WO,A,93 07259 (SCLEROSE-FORENINGEN ( THE DANISH MS-SOCIETY )) 15 April 1993 ---</p>	17-19
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.19, no.7, 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1513 - 1520 G. LA MANTIA ET AL 'Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells' cited in the application see the whole document ---</p>	
P,A	<p>WO,A,94 28138 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON) 8 December 1994 *the whole document especially sequence ID. no 4 * -----</p>	31-33, 35,40-45

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/95/00142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9320188	14-10-93	FR-A- 2689519	08-10-93
		FR-A- 2689520	08-10-93
		CA-A- 2110702	14-10-93
		CA-A- 2110703	14-10-93
		EP-A- 0587873	23-03-94
		EP-A- 0592636	20-04-94
		FR-A- 2689521	08-10-93
		WO-A- 9320189	14-10-93
WO-A-9307259	15-04-93	AU-A- 2770992	03-05-93
		CA-A- 2121030	15-04-93
		EP-A- 0609305	10-08-94
WO-A-9428138	08-12-94	AU-B- 6760094	20-12-94